# Charakterisierung Chromosomaler Proteine von Nativem Chromatin und Mononucleosomen aus Rattenleber mit Hilfe Elektrophoretischer Trennverfahren

## (Ein Methodischer Beitrag)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
dem
Fachbereich Biologie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hermann Heßlinger
aus München

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549227_0009

# Charakterisierung Chromosomaler Proteine von Nativem Chromatin und Mononucleosomen aus Rattenleber mit Hilfe Elektrophoretischer Trennverfahren

## (Ein Methodischer Beitrag)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
dem
Fachbereich Biologie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hermann Heßlinger
aus München

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof.Dr.Pollow
2. Referent: Prof.Dr.Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1978

Inhaltsverzeichnis Seite


| | | |
|---|---|---|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Existenz von Nucleosomen | 2 |
| 1.2 | Nucleosomen "Core" und Inter-Core Bereiche | 3 |
| 1.3 | Nichthiston chromosomale Proteine | 5 |
| 1.4 | Problemstellung der vorliegenden Arbeit | 7 |
| 2 | Material und Methoden | 9 |
| 2.1 | Abkürzungen | 9 |
| 2.2 | Material | 9 |
| 2.2.1 | Substanzen | 9 |
| 2.2.2 | Gewebe | 10 |
| 2.3 | Methoden | 10 |
| 2.3.1 | Zellkernisolierung | 10 |
| 2.3.2 | Chromatinpräparation | 14 |
| 2.3.3 | Chromatin-Dissoziation | 16 |
| 2.3.3.1 | 0.4 M Guanidinrhodanid Dissoziation | 16 |
| 2.3.3.2 | 3 M NaCl - Dissoziation | 17 |
| 2.3.3.3 | 2 M Guanidinrhodanid Dissoziation | 17 |
| 2.3.4 | Nucleosomenpräparation | 19 |
| 2.3.5 | Dissoziation von Mono - Nucleosomen | 21 |
| 2.3.6 | Präparation von Nucleoplasma | 21 |
| 2.3.7 | Präparation von Cytoplasma | 22 |
| 2.3.8 | Präparative isoelektrische Fokussierung mit dem Zonenkonvektions-Elektrofokussierapparat nach Valmet (51) | 23 |
| 2.3.9 | Polyacrylamidgelelektrophoresen | 24 |
| 2.3.9.1 | Mikrogelelektrophorese nach Neuhoff | 24 |
| 2.3.9.2 | Mikro-Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese zur Darstellung von Histonen und stark basischen Nichthistonkernproteinen | 27 |
| 2.3.1.0 | DNA-, RNA- und Proteinbestimmung | 28 |

Seite

3 Ergebnisse 29

3.1 Zweistufen Dissoziation von Rattenleber - chromatin 30

3.1.1 Analytische Darstellung der stark basischen chromosomalen Proteine 33

3.1.2 Präparativ und analytische Darstellung der sauren Nichthiston chromosomalen Proteine 34

3.2 3 Stufen Dissoziation von nativem Chromatin als Screening Verfahren zur Darstellung der Heterogenität chromosomaler Proteine 37

3.3 Charakterisierung chromosomaler Proteine aus Nucleosomenpräparation 43

3.4 Elektrophoretische Charakterisierung nucleoplasmatischer Proteine 53

3.5 Charakterisierung cytoplasmatischer Proteine aus Rattenleber durch elektrophoretische Trennverfahren 57

4 Diskussion 61

5 Zusammenfassung 66

6 Literaturverzeichnis 68

## 1 Einleitung

Die biochemische Forschung hat eindeutig bewiesen, daß genetische Informationen von zellulären Organismen in der DNA enthalten sind.Der Hauptanteil der DNA ist in höheren Organismen (Eukaryonten - alle Organismen außer Bakterien und Blaualgen) in einem Zellkern lokalisiert und bildet mit Histonen und NHC - Proteinen das Grundgerüst der Chromosomen. Dieser DNA - Protein - Komplex, auch Chromatin genannt repräsentiert die Gene eines Zelltypes und ist eine genetisch funktionelle Einheit. Allen genetischen Strukturen ist dieses Grundelement gemeinsam, und nur dessen räumliche Anordnung oder Multiplizität bestimmt die artgebundene unterschiedliche Morphologie der Chromosomen.

Abgesehen von qualitativen Unterschieden in der DNA Zusammensetzung, sollte man erwarten, daß, ausgehend von einfacheren zu komplexeren Organismen, die Menge von DNA pro haploidem Genom proportional zur tatsächlichen biochemischen Komplexität ansteigt. Das ist jedoch nicht immer der Fall. Während höhere Pflanzen und Tiere viel mehr DNA enthalten als niedere, gibt es bestimmte Fische, Amphibien und höhere Pflanzen, deren Zellen 25 mal mehr DNA besitzen als Säugetierzellen(s.Tabelle).

Tabelle 1

DNA Gehalt pro Zelle in Prokaryonten und pro haploidem Chromosomensatz in Eukaryonten (1)

| | | DNA - Gehalt ( x $10^{-12}$ g) |
|---|---|---|
| Prokaryonten | | |
| | T 4 Phage | 0.00022 |
| | E. coli | 0.0045 |
| Eukaryonten | | |
| | Drosophila melanogaster | 0.10 |
| | Maus | 2.50 |
| | Mensch | 3.20 |
| | Lathyrus sylvestris | 11.63 |

Jedoch kann man hier auf keine größere biologische Komplexität schließen. Vielmehr liegt ein Teil dieser Gene in identischen Kopien vor (Gen-Redundanz), sodaß der DNA-Gehalt nicht unmittelbar mit der Zahl der in der Zelle synthetisierten Proteine in Beziehung gebracht werden kann.

Obwohl alle somatischen Zellen die gleiche Anzahl von Genen enthalten, kommt es während der Zelldifferenzierung zu einer strukturellen und funktionellen Spezialisierung bestimmter Zellen; denn nur Erythrocyten synthetisieren Hämoglobin und nur Leberzellen synthetissieren Serumalbumin.

Unabhängig von der Art des molekularen Mechanismus gibt uns diese variable Genaktivität Hinweise dafür, daß nicht alle Gene einer Zelle zum gleichen Zeitpunkt funktionsfähig sind, sondern während der Embryogenese nur zu bestimmten Zeiten und in besonderen Geweben aktiv sind.

Neuere Forschungsergebnisse lassen vermuten, daß chromosomale Proteine DNA Sequenzen zu maskieren vermögen und somit an der Regulation der Genaktivität partizipieren.

## 1.1 Existenz von Nucleosomen

Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten hat in neuerer Zeit dazu beigetragen, unsere Vorstellungen über die Chromatinstruktur grundlegend zu wandeln.

Die Existenz einer linearen Aufeinanderfolge von kugeligen Histon-Einheiten, sowohl im Interphasechromatin als auch in Metaphasechromosomen von chinesischen Hamsterzellen, wurde von Pardon et al.(2,3) postuliert, dessen Röntgenbeugungsstudien eine Superhelix von 100 A Durchmesser und einer Ganghöhe von 110 - 120 A zeigten.

Olins und Olins (4) konnten durch ihre elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Chromatinfäden die Struktur einer Perlenkette nachweisen. Nucleasespaltungen (5,6) von Chromatin haben gezeigt, daß diskrete DNA Bruchstücke entstehen, deren Größe Vielfachen von ungefähr 200 Nukleo-

tidpaaren entsprechen. Diese Befunde waren die Basis für weitere Arbeiten, um detailiertere Kenntnisse über die molekulare Architektur des Chromatins zu erhalten.

## 1.2 Nucleosomen "Core" und "Inter-Core" Bereiche

Eine eingehendere Untersuchung der Histone ergab, daß sie durch Gelelektrophorese in 5 Hauptklassen, entsprechend dem relativen Gehalt an Lysin und Arginin, getrennt werden können und man ordnet sie heute allgemein nach abnehmendem Lysin- und steigendem Argiringehalt.

Tabelle 2

Nomenklatur von Histonen (7,8)

| | alte Bezeichnung | | neues Schema | MG |
|---|---|---|---|---|
| Lysinreich | f 1 | I b | H 1 | 21 000 |
| | f 2c | V | H 5 | |
| wenig Lysinreich | f 2a2 | II b1 | H2A | 14 000 |
| | f 2b | II b2 | H2B | 13 774 |
| Argininreich | f 3 | III | H 3 | 15 324 |
| | f 2a1 | IV | H 4 | 11 282 |

Wie der Tabelle 2 und der Literaturstelle 7 zu entnehmen ist, sind die Fraktionen H 1 und H2B lysinreich, während H4 und H3 Argininreich sind. Histon H2A, dessen molares Verhältnis von Lysin zu Arginin ca 1 beträgt, nimmt hierbei eine Zwischenstellung ein. Obwohl der Aminosäuregehalt der einzelnen Histonfraktionen über einen weiten Bereich streut, können die Fraktionen doch durch bestimmte Merkmale charakterisiert werden. H1 beispielsweise enthält doppelt soviel Prolin, das die Ausbildung der α-Helix inhibiert, als andere Fraktionen. H2B hat einen hohen Anteil von Serin, H2A einen hohen Leucin Gehalt. Die H3

Fraktion enthält als einzige Cystein und H4 kann am hohen Glycin Gehalt charakterisiert werden. Die Histonfraktionen kommen im Chromatin in molaren Mengenverhältnissen vor und aggregieren als Heterodimere zu sphärischen Komplexen. Man vermutet, daß in jedem Nucleosom die Dimere aus H2A, H2B und aus H3, H4 jeweils zweimal vorkommen (8-10). Der durch kurzzeitige Endonucleaseverdauung freigesetzte DNA Strang von etwa 200 Basenpaaren ist mit dem monomeren Nucleosom helikal komplexiert. Die Länge des DNA Stranges im Monomer variiert bei verschiedenen Organismen erheblich (11).

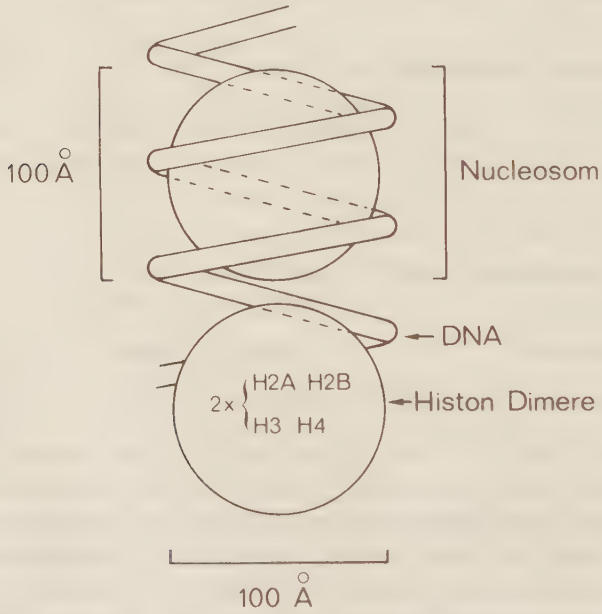



Abb. 1

Schematische Darstellung eines möglichen Modells für die Chromatinstrukur. Das Nucleosom, das als globuläre Untereinheit mit DNA komplexiert ist, baut sich aus Heterodimeren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 auf (Einzelheiten siehe Text). Das Histon H1, das möglicherweise mit dem Nucleosom assoziiert ist, verbindet entweder die Partikel der gleichen Fibrille oder die Partikel benachbarter Fibrillen.

Während bei Säugern eine DNA Länge von 178 - 207 Basenpaaren (12 - 14) gefunden wird, liegen die Werte für Pilze bei 170 (15) und für Seeigelspermien bei 241 Basenpaaren (16). Bei genügend langen Verdauungszeiten zeigte sich bei den verschiedensten Organismen ein einheitliches Nucleosomen - Core von 140 Basenpaaren (17). Es scheint sich hier um eine Struktur zu handeln, die von hoher Stabilität während der gesamten Evolution war. Die DNA außerhalb der Core Partikel variiert in der Länge in unterschiedlichen Zelltypen sehr stark und verbindet die Nucleosomen untereinander.

Dem Histon H1, das nicht am Aufbau des Core Partikels beteiligt ist, wird eine quervernetzende Rolle im Aufbau des Chromosoms zugesprochen. Es ist Organ- und Gewebespezifisch und vermag die DNA scheinbar nicht vor Nucleaseverdauung zu schützen (18).

## 1.3 Nichthiston chromosomale Proteine

In den letzten Jahren wurden erstaunliche Fortschritte bei der Isolierung, Fraktionierung und chemischen Charakterisierung von NHC - Proteinen gemacht.

Als NHC - Proteine bezeichnet man all jene Proteine (ausgenommen die Histone), die zusammen mit DNA aus hochgereinigtem Chromatin- bzw.Chromosomenmaterial isoliert werden. Sie sind viel komplexer als die Histone und ihre Anzahl streut von 20 - 450 (19-22) bei Auftrennung durch die SDS Gelelektrophorese. Die Analyse läßt vermuten, daß ca 20 Hauptproteine quantitativ 50 - 70% der NHC Proteinfraktion ausmachen.

Die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der NHC-Proteine unterscheiden sich wesentlich von denen der Histone. So zeigt die Aminosäurezusammensetzung im Verhältnis von sauren zu basischen Resten Werte von 1.2 - 1.6, die Molekulargewichte liegen zwischen

10 000 und einigen hunderttausend Dalton (22 - 24) und die isoelektrischen Punkte reichen von 2 - 9 (25,26).

Es scheint, daß Histone fast ausschließlich in der S-Phase von der Zelle bereit gestellt werden, während NHC - Proteine über den ganzen Zellzyklus einschließlich Mitose synthetisiert werden (32 - 34). Die Syntheserate von NHC - Proteinen ist höher als die der Histone und kann durch Hormone stimuliert werden (35,36).

NHC - Proteine sind in begrenztem Umfange nicht nur gewebe- und artspezifisch (27,28), sondern spielen auch eine allgemeine strukturelle und enzymatische Rolle im Prozeß der Genaktivierung(29,30). Reassoziationsstudien haben gezeigt, daß sie eine positive regulatorische Funktion in der Genexpression ausüben (30,31). Hochspezifische Enzyme vermögen die NHC - Proteine zu acetylieren (37), methylieren (38) und phosphorylieren (28). Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung erfolgt an Serin und Threonin Resten und wird verantwortlich gemacht für die Kontrolle der Genexpression.

Obwohl bekannt ist, daß die DNA irgendwie mit dem Nucleosomen Core komplexiert ist, so weiß man doch nichts über die Struktur im Detail. Wie sind Histone untereinander organisiert und wo sind Berührungspunkte zwischen DNA und Protein?

Die wichtigste Frage zielt jedoch auf die Beziehung zwischen Struktur und biologischer Aktivität ab. Welche strukturellen Modifikationen sind nötig, um Replikation und Transkription zu ermöglichen? Sind im Transkriptionsprozeß die Nucleosomen präsent oder in der Zusammensetzung und Konformation modifiziert? Die Beantwortung all dieser Fragen ist sicherlich von einem detailierterem Wissen um die Chromatinstruktur abhängig.

## 1.4 Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Um das Verständnis über die komplexe Struktur des Chromatins und über die biologische Funktion der am Chromatinaufbau beteiligten Proteine zu vertiefen, ist es notwendig, Methoden zu entwickeln, die eine hochauflösende Fraktionierung und Reinigung dieser Proteine erlaubt. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel durch Mikromethoden die Heterogenität der chromosomalen Proteine im nativen Chromatin und in Chromatinsubfraktionen (Nucleosomen) darzustellen.

Im Laufe der Zeit sind eine Vielzahl von Methoden für die Präparation chromosomaler Proteinkomponenten entwickelt worden (39 - 44). Die meisten der Methoden bauen auf Bedingungen für die Extraktion chromosomaler Proteine auf, die zu einer irreversiblen Denaturierung der Proteine führen. Andererseits führen schonende Extraktionsprozeduren nur zu einer teilweisen Abschälung der chromosomalen Proteine von der Chromatin DNA. Die Einführung von Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid enthaltenen Medien (45) zur Dissoziation von Chromatin in DNA und chromosomale Proteine führte zu einer Ablösung von ca 85% der chromosomalen Proteine, aber die nachfolgende Fraktionierung der vor allem nichthistonen chromosomalen Proteine mit elektrophoretischen Trennverfahren führte aufgrund der aggregierenden Eigenschaften dieser Proteinklasse nur zu einem begrenzten Erfolg.

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden beschrieben, die

1) die Extraktion von mindestens 96% der chromosomalen Proteine nativen Chromatins bzw. von Chromatinsubfraktionen(Nucleosomen) erlauben,
2) die Separierung der Hauptkomponenten von Chromatin-, DNA, Histone und Nichthistone chromosomale Proteine voneinander und
3) die hochauflösende Fraktionierung der sogenannten

"sauren" Nichthiston chromosomalen Proteine und der stark basischen Nichthiston chromosomalen Proteine in mehrere Hauptklassen durch die Kombination aus Isoelektrofokussierung unter Verwendung einer Valmet Apparatur im präparativen Maßstab, eine Methode die hohe Trennschärfe mit hoher Beladungskapazität kombiniert, und durch Mikrogradientengelelektrophoresen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Abkürzungen

| | |
|---|---|
| NHCP | Nichthiston chromosomale Proteine |
| TCA | Trichloressigsäure |
| OD | Optische Dichte |
| BIS | N, N' - Methylenbisacrylamid |
| TEMED | N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| SDS | Dodecylsulfat - Na - Salz |
| Tris | Tris (hydroxymethyl) - aminomethan |
| Bis-Tris | (bis(2-Hydroxyäthyl) imino - tris (Hydroxymethyl) methan) |
| MES | 2 ( N-Morpholino) äthan - Sulfonsäure |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| MG | Molekulargewicht |
| IP | Isoelektrischer Punkt |

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Substanzen

| | |
|---|---|
| Fluka AG, Buchs SG: | Thioglycerin, Guanidinrhodanid |
| Fa.Roth, Karlsruhe: | Histonsulfat |
| LKB Produkter,Stockholm | Ampholine pH 3 - 10 |
| Behringwerke,Marburg/ Lahn: | Rinderserumalbumin (RHD 20) |
| Boehringer, Mannheim | DNA aus Kalbsthymus, RNA aus Hefe<br>Cytochrom c, Aldolase, Phosphorylase a |

| | |
|---|---|
| Serva, Heidelberg: | Triton X 100, Dithioerythrit Amidoschwarz 10 B extra, Coomassie Brillant Blue G-250, Acrylamid(umkrist.aus Chloroform), N,N'-Mehtylenbisacrylamid(umkrist.aus Aceton) Temed,Diphenylamin, SDS (umkrist. aus Äthanol), Thioglycolsäure |
| E.Merck, Darmstadt: | Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Ammoniumperoxodisulfat, Guanidiniumhydrochlorid, Orcin krist., Bromphenolblau |
| Gurr Ltd., London: | Pyronin A |
| Worthington | Micrococcal Nuclease |
| Sigma | Spermine, Spermidine |

2.2.2 Gewebe

Als Ausgangsmaterial dienten die Lebern 100 geschlechtsreifer weiblicher Wistarratten vom Typ Albino aus eigener Zucht (Altrumin Futter, Wasser ad libitum, Gewicht 200 - 250 g).

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkernisolierung

Puffermedien:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Medium A | 0.01 | M Tris/HCl | pH 7.4 |
| | 1.5 | mM EDTA | |
| Medium B | 0.05 | M Tris/HCl | pH 7.4 |
| | 0.025 | M KCl | |
| | 0.01 | M $MgCl_2$ | |
| | 0.024 | M Thioglycerin | |
| | 0.5 | % Triton-X-100 (v/v) | |
| | 0.25 | M Saccharose | |
| | 0.005 | M $NaHSO_3$ | |
| Medium C | Medium B ohne Triton-X-100 | | |
| Medium D | Medium C mit 0.8 M Saccharose | | |
| Medium E | Medium C mit 2.2 M Saccharose | | |

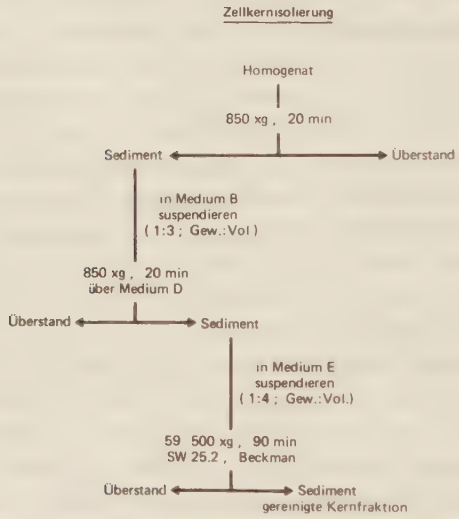
Die Zellkernisolierung erfolgte in Anlehnung an die von Blobel und Potter (46) beschriebene Methode. Den durch Decapitieren getöteten Ratten wurde nach Ausbluten die Lebern entnommen, in einskaltem Medium A (0.01 M Tris/HCl - 1.5 mM EDTA - pH 7.4) gewaschen und mit der Schere zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe 1:5 (Gew./Vol.) mit Medium C (0.05 M Tris/HCl - 0.025 M KCl - 0.01 M $MgCl_2$ - 0.024 M Thioglycerin - 0.25 M Saccharose - 0.005 M $NaHSO_3$ - pH 7.4) versetzt und im Ultra Turrax (Janke & Kunkel KG Staufen i.Br.) für 3 x 10 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel (Typ Potter Elvehjem, Fa.Braun Melsungen, Modell S) übergeführt und durch fünfmaligen Vor- und Rücklauf bei 1500 Upm rehomogenisiert. Nach Filtrieren des Homogenats durch 5 Lagen Verbandsmull wurde das Filtrat für 20 Minuten bei 850 x g zentrifugiert (siehe Schema 1).

Das Sediment wurde 1:3 (Gew./Vol.) mit Medium B (0.05 M Tris/HCl - 0.025 M KCl - 0.01 M $MgCl_2$ - 0.024 M Thioglycerin - 0.5% Triton - X - 100 - 0.25 M Saccharose - 0.005 M $NaHSO_3$ - pH 7.4) versetzt und durch 5 Strokes in einem locker eingepaßten Dounce homogenisiert, über das zweifache Volumen Medium D (0.05 M Tris/HCl - 0.025 M KCl - 0.01 M $MgCl_2$ - 0.024 M Thioglycerin - 0.8 M Saccharose - 0.005 M $NaHSO_3$ - pH 7.4) geschichtet und nach Durchrühren der Grenzphasen mit einem Glasstab für 20 Minuten bei 850 x g sedimentiert. Das weiße, sämige aber nicht viskose Sediment wurde im Phasenkontrastmikroskop auf Reinheit der Kerne untersucht. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Kernsediment in vierfachem Volumen Medium E (0.05 M Tris/HCl - 0.025 M KCl - 0.01 M $MgCl_2$ - 0.024 M Thioglycerin - 2.2 M Saccharose - 0.005 M $NaHSO_3$ - pH 7.4) aufgenommen, durch einen Stroke im Dounce suspendiert, über Medium E geschichtet und nach Durchrühren der Phasengrenze mit einem Glasstab für 90 Minuten bei 59 500 x g im SW

25.2 Rotor in der Beckman Ultrazentrifuge L 2 - 65 B zentrifugiert.

Das Sediment entsprach der "gereinigten Kernfraktion". Die Kontrolle des Reinheitsgrades erfolgte durch Elektronenmikroskopie(Abb.2).

Schema 1




| | | | |
|---|---|---|---|
| Medium B | 0,05 | M | Tris / HCl – pH 7.4 |
| | 0.025 | M | KCl |
| | 0.01 | M | $MgCl_2$ |
| | 0.024 | M | Thioglycerin |
| | 0.5 | % | Triton X – 100 ( v/v ) |
| | 0.25 | M | Saccharose |
| | 0.005 | M | $NaHSO_3$ |
| Medium D | Medium B | | ohne Triton X – 100 |
| | | | mit 0.8 M Saccharose |
| Medium E | Medium D | | mit 2.2 M Saccharose |

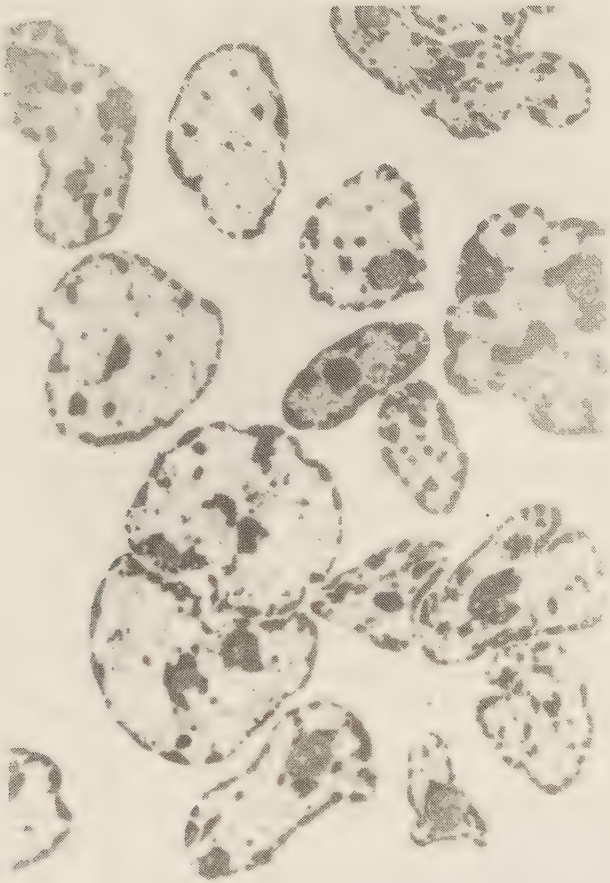


Abb. 2
Elektronenmikroskopische Aufnahme hochgereinigter Kerne (Vergrößerung 13 800 fach).

### 2.3.2 Chromatinpräparation

Puffermedien:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Medium F | 0.075 | M NaCl | pH 7.9 |
| | 0.024 | M EDTA | |
| | 0.001 | M $NaHSO_3$ | |
| Medium G | 0.01 | M Tris/HCl | pH 7.9 |
| | 0.001 | M $NaHSO_3$ | |
| Medium H | 0.002 | M Tris/HCl | pH 7.9 |
| | 0.001 | M $NaHSO_3$ | |

Die Lyse der inneren Kernmembran erfolgte nach der Methode von Graziano und Huang (30) durch Saline-EDTA Waschungen und sukzessive Erniedrigung der Ionenkonzentrationen. Das Kernsediment wurde im zehnfachen Volumen Medium F(0.075 M NaCl - 0.024 M EDTA - 0.001 M $NaHSO_3$ - pH 7.9) homogenisiert und 20 Minuten bei 12 300 x g zentrifugiert. Die Saline EDTA Waschung wurde zweimal wiederholt.

Anschließend wurde das Sediment zweimal in Medium G (0.01 M Tris/HCl - 0.001 M $NaHSO_3$ - pH 7.9) gewaschen und für jeweils 20 Minuten bei 49 200 x g zentrifugiert. Im letzten Schritt erfolgte die Aufnahme des Sediments in Medium H (0.002 M Tris/HCl - 0,001 M $NaHSO_3$ - pH 7.9), resuspendieren im Dounce und abzentrifugieren des Chromosomenmaterials bei 49 200 x g für 90 Minuten. Der Vorgang wurde einmal wiederholt.

Das nach der oben beschriebenen Methode gewonnene Chromosomenmaterial wurde als Chromatin bezeichnet. Der Reinheitsgrad von Chromatin wurde elektronenoptisch und durch Spektralanalyse kontrolliert(siehe Abb. 3).

Abb. 3

Elektronenoptische Aufnahme hochgereinigten Chromatins (Vergrößerung 12 000 x 3)

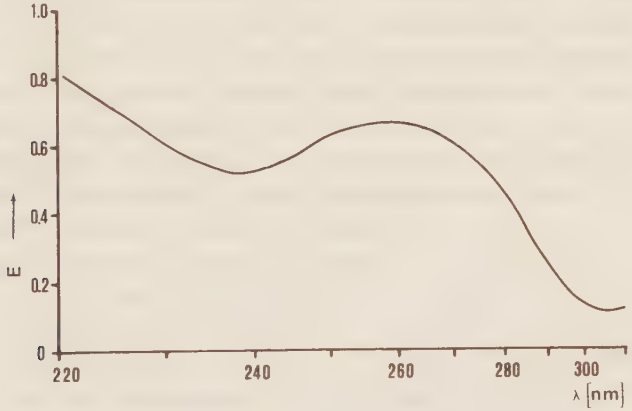



Abb. 4

Absorptionsspektrum von Rattenleber Chromatin

2.3.3 Chromatin - Dissoziation

2.3.3.1 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid - Dissoziation

Das Chromatin wurde auf die Endkonzentration des Dissoziationspuffers 1 (6 M Harnstoff - 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid - 2 mM Dithioerythrit - 1.5 mM $NaHSO_3$ - 2 mM EDTA - 0.2 M Natriumphosphat - pH 7) gebracht. Die Chromatinlösung wurde für 10 Stunden bei 4 $^{o}$ C gerührt und anschließend für 40 Stunden bei 183 400 x g im Ti 70 Rotor bei 4$^{o}$ C in der Beckman Ultrazentrifuge L2 65 B zentrifugiert. Das Sediment enthielt das partiell dissoziierte Chromatin.

Die im Überstand enthaltenen chromosomalen Proteine wurden einer Bio-Rex 70 Ionenaustauschchromatographie unterworfen. Die Vorbehandlung und Reinigung des Kationenaustauschers Bio-Rex 70 erfolgte nach der Methode von Hirs (48). Die Äquilibrierung erfolgte in 6 M Harnstoff, 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid, 2 mM Dithioerythrit, 1.5 mM $NaHSO_3$, 2 mM EDTA, 0.1 M Natriumphosphat - pH 7. Der Durchmesser der Säule betrug 1.5 cm, die Füllhöhe 20 cm. Entsprechend den Bedingungen von Levy et al.(45) wurden die im Äquilibrierungspuffer gelösten chromosomalen Proteine der ersten Dissoziationsstufe auf die Bio-Rex 70 Säule aufgebracht. Anschließend wurde die Säule mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, wobei die Nichthistonkernproteine als Filtrat aufgefangen werden konnten. Die Histone und die stark basischen NHC-Proteine wurden durch Pufferwechsel(6 M Harnstoff - 4 M Guanidiniumhydrochlorid - 2 mM Dithioerythrit - 1.5 mM $NaHSO_3$ - 2 mM EDTA - 0.1 M Natriumphosphat - pH 7) eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/Std. Die nicht adsorbierten im Filtrat enthaltenen Kernproteine (saure Nichthistone chromosomale Proteine) wurden mit 4 M Ammoniumsulfat - 2 mM Mercaptoäthanol - pH 7 für 35 Stunden bei 4$^{o}$ C im Dialyseschlauch gefällt, der Proteinniederschlag bei 27 700 x g im SW 25.2

Rotor der Fa.Beckman für 20 Minuten sedimentiert. Um das Kernproteinsediment zu lösen, wurde anschließend für 15 Stunden gegen 7 M Harnstoff und 50 mM Dithioerythrit dialysiert und das so gelöste Protein bei 37° C für 3 Stunden inkubiert.

Die von der Säule eluierten Histone und stark basischen Nichthistonkernproteine wurden gegen 0.1 N. Essigsäure und 5 mM Mercaptoäthanol für 15 Stunden dialysiert. Anschließend wurde eine Alkohol/Äther - Fällung (Äthanol/Äther/Wasser wie 3:1:1, 5 mM Mercaptoäthanol) bei dreimaligem Wechsel gegen die zehnfache Menge bei 4° C im Dialyseschlauch durchgeführt. Die ausgefällten Proteine wurden in 5 mM Mercaptoäthanol/ Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

2.3.3.2 3 M NaCl-Dissoziation

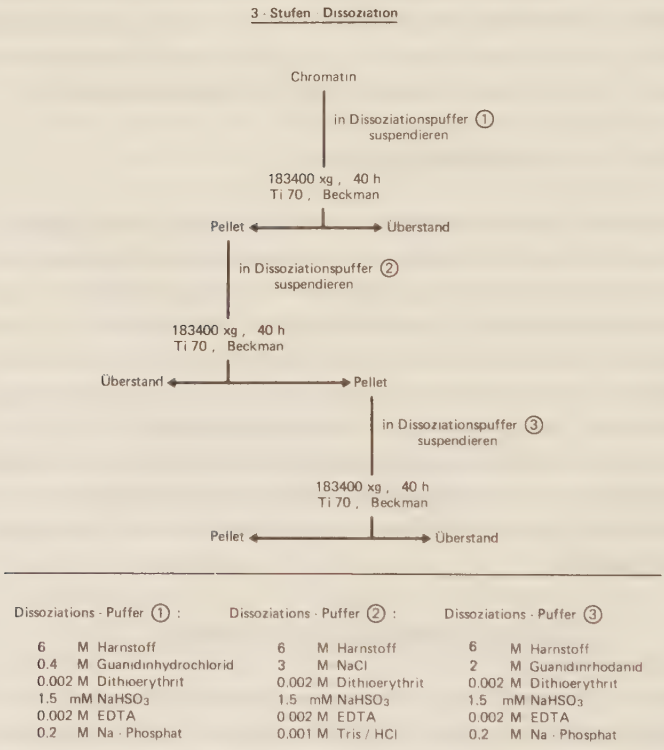
Das nach 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid Dissoziation gewonnene Sediment des partiell dissoziierten Chromatins wurde in Dissoziationspuffer 2 (6 M Harnstoff - 3 M NaCl- 2 mM Dithioerythrit - 1.5 mM $NaHSO_3$ - 2 mM EDTA - 1 mM Tris/HCl - pH 8.3) aufgenommen und für 10 Stunden bei 4°C gerührt. Anschließend wurde im Ti 70 Rotor 40 Stunden bei 183 400 x g und 4° C zentrifugiert.
Der so gewonnene Überstand wurde auf die Äquilibrierungsbedingungen der Bio-Rex 70 Ionenaustauschersäule umdialysiert und anschließend wie unter 2.3.3.1 beschrieben behandelt.

2.3.3.3 2 M Guanidinrhodanid-Dissoziation

Das nach 3 M NaCl Dissoziation gewonnene Sediment wurde in Dissoziationspuffer 3 (6 M Harnstoff - 2 M Guanidinrhodanid - 2 mM Dithioerythrit - 1.5 mM $NaHSO_3$ - 2 mM EDTA - 0.2 M Natriumphosphat - pH 7) aufgenommen und für 10 Stunden bei 4°C gerührt. Anschließend wurde im Ti 70

Rotor für 40 Stunden bei 183 400 x g zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde auf die Äquilibrierungsbedingungen der Bio-Rex Ionenaustauschersäule umdialysiert und anschließend wie unter 2.3.3.1 beschrieben behandelt.

Schema 2

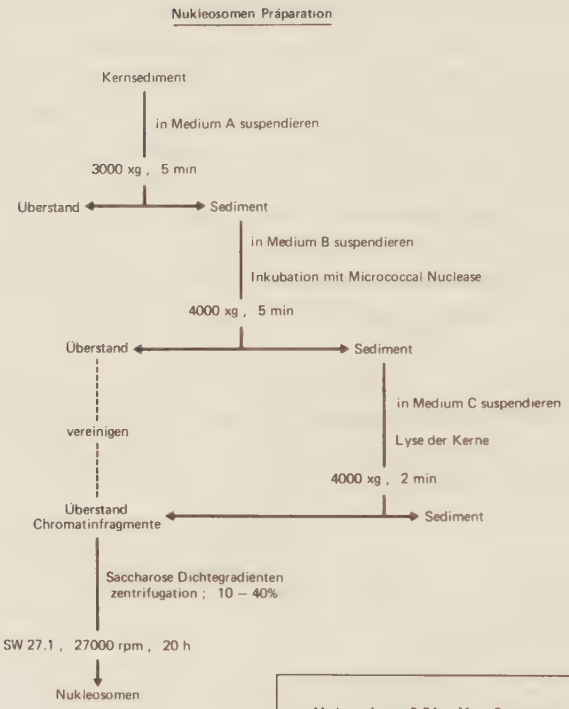


### 2.3.4 Nucleosomenpräparation

Das hochgereinigte Kernsediment wurde nach der Methode von Lewish und Burgoyne (47) in 0.34 M Sucrose Puffer A (siehe Schema 3)aufgenommen (Kerne von 2 g Leber per ml Puffer), durch mehrere Strokes im Dounce suspendiert und für 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde im Puffer B (siehe Schema 3) resuspendiert und für 10 Minuten bei 37°C präinkubiert. Die Inkubation der Kernsuspension wurde mit 20 U Micrococcal Nuclease (Worthington) per g Gewebe durchgeführt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Na-EDTA (pH 7, Endkonzentration 0.2 mM)und Kühlen in Eis abgestoppt. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert.

Die im Sediment verbleibenden ganzen Kerne wurden durch Suspension in 0.2 mM NaEDTA (pH 7) lysiert und 2 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Chromatin Untereinheiten (Nucleosomen).

Schema 3




| | | | |
|---|---|---|---|
| Medium A | 0.34 | M | Sucrose |
| | 60 | mM | KCl |
| | 15 | mM | NaCl |
| | 0.15 | mM | Spermine |
| | 0.5 | mM | Spermidine |
| | 15 | mM | Mercaptoäthanol |
| | 15 | mM | Tris / HCl – pH 7.4 |
| Medium B | Medium A + 1 mM $CaCl_2$ | | |
| Medium C | 0.2 | mM | $Na_2$EDTA – pH 7 |

Jeweils 2 ml des 4000 x g Überstandes wurden über einen linearen Saccharosegradienten (10 - 40% Saccharose, Gew./Vol.) geschichtet und für 20 Stunden bei 27 000 rpm (Rotor SW 27.1, Firma Beckman) zentrifugiert. Als Referenzprotein zur Bestimmung des S - Wertes wurde Katalase verwendet. Der Gradient wurde mit Hilfe der Isco Fraktioniereinrichtung automatisch fraktioniert und in jeweils 0.6 ml der unverdünnten Fraktionen die OD bei 260 nm gemessen.

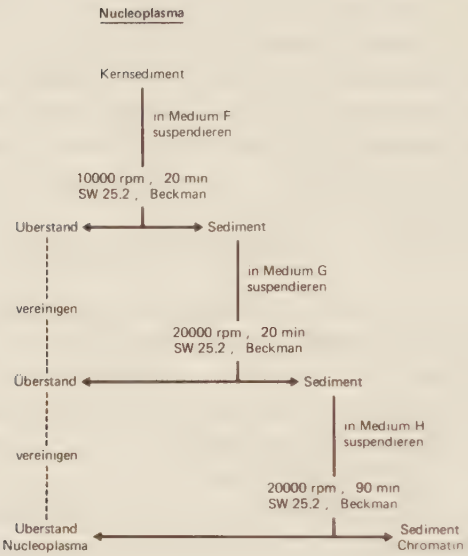
### 2.3.5 Dissoziation von Mono - Nucleosomen

Es wurden jeweils die Fraktionen der nach Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen monomeren Nucleosomen vereinigt und gegen 5 mM Mercaptoäthanol dialysiert. Die Dissoziation erfolgte mit 6 M Harnstoff - 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid - 3 M NaCl - 2 mM Dithioerythrit - 1.5 mM $NaHSO_3$ - 2 mM EDTA - 1 mM Tris/HCl - pH 8.3 für 10 Stunden bei $4^oC$. Anschließend wurde für 48 Stunden bei 183 400 x g im Rotor Ti 70 zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden gegen 6 M Harnstoff - 5 mM Mercaptoäthanol für ca 10 Std.dialysiert.

### 2.3.6 Präparation von Nucleoplasma

Die bei der Chromatinpräparation aus hochgereinigtem Kernsediment anfallenden Überstände (Abschnitt 2.3.2 und Schema 4) wurden vereinigt, mit 10%-iger fester Trichloressigsäure (Gew./Vol.) versetzt und für 10 Minuten bei $4^o$ gerührt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 850 x g zentrifugiert, das Sediment einmal mit 5%-iger TCA Lösung (1:10, Packg./Vol.) gewaschen und für 10 Minuten bei 850 x g zentrifugiert. Dann wurde die Proteinfällung zweimal in Äthanol/Äther(3:1)aufgenommen und nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 850 x g abschließend zweimal mit Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Schema 4

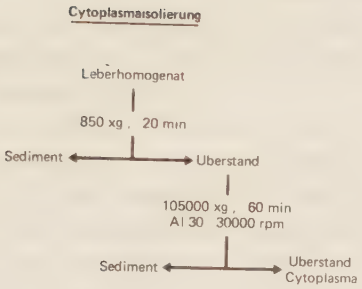



| | | | |
|---|---|---|---|
| Medium F | 0.075 | M | NaCl |
| | 0 024 | M | EDTA |
| | 0.001 | M | $NaHSO_3$ |
| Medium G | 0.01 | M | Tris / HCl |
| | 0 001 | M | $NaHSO_3$ |
| Medium H | 0 002 | M | Tris / HCl |
| | 0 001 | M | $NaHSO_3$ |

## 2.3.7 Präparation von Cytoplasma

Der bei der fraktionierten Dichtegradientenzentrifugation von Leberhomogenat anfallende 850 x g Überstand wurde zur Gewinnung der Cytoplasmafraktion für 60 Minuten bei 105000 x g (Rotor Al 30, Firma Beckman) zentrifugiert. Das Sediment enthielt subzelluläre Partikel, der Überstand das Cytoplasma.

Schema 5




2.3.8 Präparative isoelektrische Fokussierung mit der Zonenkonvektions-Elektrofokussier-Apparatur nach Valmet (51).

A) Etwa 56 ml Lösung (6M Harnstoff - 50 mM Dithioerythrit- 3% Ampholine - pH 3.5 - 10), 100 mg Mononucleosomen bzw. 500 mg chromosomale Proteine wurden in 1.9 mlPortionen auf 29 Tröge verteilt. Der Anodentrog wurde mit 1.9 ml Anodenflüssigkeit (10% Saccharose - 6 M Harnstoff - verdünnter Phosphorsäure - pH 1.5) gefüllt, der Kathoden - trog mit 1.9 ml Kathodenflüssigkeit (10% Saccharose -6M Harnstoff - verdünnter Äthylendiaminlösung - pH 11.5). Die Isoelektrofokussierung wurde bei $4^{o}C$ mit einer konstanten Leistung von 3 Watt durchgeführt. Nach ca 60 Stunden war die Elektrophorese beendet. Die Anfangs - spannung erhöhte sich von 500 Volt auf 1000 Volt End - spannung, wobei die Stromstärke auf einen konstanten Wert von 3 mA absank. In jedem einzelnen Trog wurde der pH Wert gemessen.

Die monosomen Einzelfraktionen wurden gegen 1 mM NaCl - 0.2 mM EDTA - pH 7 für 10 Stunden dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Jeweils in einem Aliquot der Fraktionen wurde Protein, DNA und RNA bestimmt.

Die durch Isoelektrofokussierung aufgetrennten chromosomalen Proteine wurden für ca 20 Stunden gegen 6 M Harnstoff dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

B) Der nach Saccarose - Gradientenzentrifugation von Nuclease behandeltem Chromatin gewonnene Überstand wurde gegen 7M Harnstoff - 2mM Mercaptoäthanol für 15 Stunden dialysiert, mit 4 M Ammoniumsulfat - 2 mM Mercaptoäthanol - pH 7 für 35 Stunden bei 4°C im Dialyseschlauch gefällt und der Proteinniederschlag bei 27 700 x g im SW 25.2 Rotor der Fa.Beckman für 20 Minuten sedimentiert. Um das Protein - sediment zu lösen, wurde anschließend für 15 Stunden gegen 7 M Harnstoff und 50 mM Dithioerythrit dialysiert und das so gelöste Protein bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Ca 50 mg Protein wurden auf die Valmet aufgegeben und wie unter 2.3.9 beschrieben isoelektrofokussiert.

C) Die nach Trichloressigsäure Fällung gewonnenen Proteine (ca 100 mg) des Nucleoplasma wurden wie unter 2.3.9 beschrieben isoelektrofokussiert.
Desgleichen die cytoplasmatischen Proteine, die vor der Isoelektrofokussierung 15 Stunden gegen Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet wurden.

2.3.9 Polyacrylamidgelelektrophoresen

2.3.9.1 Mikrogelelektrophorese nach Neuhoff (52 - 55)

| | |
|---|---|
| Lösung A | 70 mg Ammoniumperoxodisulfat |
| | 100 ml $H_2O$ |
| Lösung B | 3.39 g Tris |
| | 6ml 1N $H_2SO_4$ |
| | 0.1 ml Temed |
| | 6 N $H_2SO_4$ auf pH 8.8 |
| | $H_2O$ ad 10 ml |

| | |
|---|---|
| Lösung C | 20 g Acrylamid<br>400 mg Bisacrylamid<br>$H_2O$ ad 37.5 ml |
| Elektrophorese-puffer | Anodenpuffer<br>0.6 g Tris<br>2.88 g Glycin<br>0.1 g SDS<br>$H_2O$ ad 100 ml, pH 8.4<br>Kathodenpuffer<br>wie Anodenpuffer<br>+ 0.1% Thioglykolsäure<br>mit Tris auf pH 8.4 |
| SDS-Inkubations-puffer | 1 % SDS<br>1% Mercaptoäthanol<br>10% Glycerin<br>0.035 M Tris/Sulfat pH 8.6 |

Für die Herstellung einwandfreier Gelgradienten mußten gereinigte Kapillaren (10 ul Brand Einmal - Mikropipetten) verwendet werden. Die Reinigung erfolgte in Nitratschwefelsäure für 4 Stunden in einer Saugflasche mit einer Vakuumluftdruckfrequenz von 5 Minuten. Anschließend wurden die Kapillaren mit Wasser in einer Filternutsche bis zum Neutralpunkt gereinigt und mit Alkohol und p.a.Aceton gespült. Die Mikrokapillaren wurden bei 80 $^{o}$ C getrocknet. Der kontinuierliche Polyacrylamidkonzentrationsgradient baute sich spontan auf nach Durchmischung der Peroxodisulfat enthaltenden Phase (Lösung A) und einer zweiten, alle übrigen Komponenten enthaltenden Phase. Eine 0.07% - ige Ammoniumper - oxodisulfatlösung (Lsg.A) wurde 18 mm hoch in eine 32 mm lange 10 ul Kapillare gesaugt aufgrund von Kapillarattraktion. Die restlichen 14 mm wurden mit den Lösungen B/C im Mischungsverhältnis 1:3 gefüllt. Zur Polymerisation wurden die ge -

füllten Kapillaren an die Wand einer Kristallisierschale (Durchmesser 3 cm) gestellt,dessen Boden mit einer 50%-igen Saccharoselösung bedeckt war. Der Elektrodenpuffer setzte sich zusammen aus 0.05 M Tris/Glycin pH 8.4 und 0.1% SDS. Dem kathodischen Elektrodenpuffer wurde als Reduktions - mittel 0.1% (Vol./Vol.) Thioglykolsäure zugefügt. Die Gele waren bis zu 6 Monaten in 1:8 verdünnter Lösung B bei 4°C haltbar.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 2 mg NHC - Proteinfraktionen nach Isoelektrofokussierung in der Valmet Apparatur gewonnen und in 1ml SDS Inkubationspuffer für 2 Minuten bei 100°C inkubiert. 2 ug SDS beladenes Protein wurde entsprechend der Methode von Rüchel et al. in 10 ul Kapillaren über einen kontinuierlichen Acrylamid - gradienten von 1 - 40 % in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Elektrodenpuffer: 0.05 M Tris/Glycin - pH 8.4 - 0.1 % SDS, Gelpuffer: 2.8 M Tris/Sulfat - pH 8.8) elektrophoretisch getrennt. Die Anfangsspannung betrug in den ersten 5 Minuten 40 Volt, dann bis zum Austritt der Farbstoffront (100 mM Bromphenolblau in 10% Glycerin) 80 Volt und anschließend für 30 Minuten 100 Volt.

Als Markerproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten Phosphorylase a (MG 92 500), Aldolase (MG 39 500) und Cytochrom c (MG 12 500). Die Fixierung und Anfärbung der Gele wurde für 10 Minuten bei 50°C in 0.187% Coomassie Brillant Blue - 93% wäßriger Methanollösung - 7% Eisessig durchgeführt. Entfärbt wurden die Gele in 7% Eisessig für 12 Stunden. Die Gele wurden bei -30°C eingefroren. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Agfa - Ortho 25 Film fotografiert und entsprechend vergrößert.

2.3.9.2 Mikro-Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese zur Darstellung von Histonen und stark basischen Nichthistonkernproteinen.

Die Histone und stark basischen NHC-Proteine wurden nach den Methoden von Subramanian(56 - 59) und Bogorad (60) elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Lsg. A
1 g Acrylamid (4%)
125 mg Bisacrylamid
0.3 g Bis-tris
12 g Harnstoff
$H_2O$ ad 25 ml, mit 50% Essigsäure auf pH 5

Lsg. B
10 g Acrylamid (10%)
250 mg Bisacrylamid
3 g Bis-tris
$H_2O$ ad 100 ml, mit 1 N HCl auf pH 6.75

Lsg. C
0.4 g Acrylamid (4%)
50 mg Bisacrylamid
4.2 g Harnstoff
20 mg SDS
0.31 g Bis-tris
$H_2O$ ad 10 ml, mit 1 N HCl auf pH 6.75

Für die Herstellung von Rundgelen in der ersten Dimension wurden 5 cm lange mit Aceton gereinigte Schmelzpunktröhrchen verwendet. Zu 2 ml Lösung A wurden 10 ul Temed und 24 ul 7% Ammoniumperoxodisulfat zugegeben und durchmischt. Aufgrund von Kapillarattraktion wurden die Röhrchen bis zur 4 cm Kennmarke gefüllt und zur Polymerisation (ca 45 min) schräg gelagert.
Die Histone und basischen NHC-Proteine (4.5 mg/ml) wurden

in 0.9 N Essigsäure - 6 M Harnstoff - 50% Glycerin gelöst und hiervon etwa 10 ul (= 45 ug) pro Gel aufgegeben. Zur Markierung der Pufferfront diente Pyronin A. Als Anoden - puffer diente 0.01 M Bis-tris (pH 4), als Kathodenpuffer 0.18 M Kaliumacetat (pH5). Die Elektrophorese des Protein-gemisches erfolgte zunächst bei 150 Volt für 1 Stunde und dann bei 165 Volt für 10 Minuten.

Für die zweite Dimension wurden 10%-ige Plattengele(5 x 7.5 x 0.08, pH 6.75) in einer von Wool(57) entwickelten Apparatur gegossen. Hierzu wurde 100 ml Lösung B mit 0.2 ml Temed und 1 ml 7% Ammoniumperoxodisulfat versetzt und zur Polymerisation gebracht.

Zur Beladung der Proteine wurde auf jedes Plattengel ein 4%-iges SDS Streifengel (pH 6.75) aufpolymerisiert. Zu je 10 ml Stammlösung wurden 30 ul Temed und 120 ul 7% Ammonium-peroxodisulfat zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 65 Volt für 1 Stunde, wobei 0.2% SDS - 0.07 M Bis-tris - 0.07 M MES (pH 6.5) als kathodischer Puffer und 0.028 M Bis-tris (pH 6.75) als anodischer Puffer benutzt wurden.

Die Fixierung und Anfärbung der Gele wurde für 10 Minuten bei 50°C in 0.187% Coomassie Brillant Blue - 93% wäßriger Methanollösung - 7% Eisessig durchgeführt. Entfärbt wurden die Gele in 7% Eisessig. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Agfa Ortho 25 Film fotografiert und entsprechend vergrößert.

2.3.1.0 DNA-, RNA- und Proteinbestimmung.

DNA wurde nach der Methode von Burton (61) mit DNA aus Kalbsthymus als Eichsubstanz bestimmt. Die RNA Bestimmung erfolgte nach der Vorschrift von Ceriotti (62). Als Eich - substanz diente RNA aus Hefe.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Oyama und Eagle (63) mit Rinderserumalbumin als Eichprotein vor-genommen.

## 3 Ergebnisse

Essentielle Voraussetzung für die Analyse chromosomaler Proteine ist die Darstellung hochreinen Chromatins aus hochgereinigten Zellkernen. Das setzt die Verhinderung der Kontamination der Zellkern-bzw.Chromatinfraktion durch lösliche cytoplasmatische Proteine oder durch Membranan - teile voraus. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Kernisolierung in Gegenwart von Detergenz führt zu einer Absprengung der äußeren Kernmembranen sowie zu einem Verlust bzw. Denaturierung löslicher nuclearer Proteinbestandteile. Die Sedimentation der durch differentielle Zentrifugation gereinigten Kerne über 2.2 M Saccharose Puffer führt im Endschritt der Aufarbeitung in der Regel zur Eliminierung einer signifikanten Kontamination der Kernfraktion durch cytoplasmatische lösliche Proteine. Die elektronenoptische Kontrolle (Abb.2) der hochgereinigten Kernfraktion zeigt die Kerne mit einer intakten inneren Membran und frei von Kontamination durch cytoplasmatische Anteile.

Proteolytische Prozesse wurden durch den Proteasehemmer Natriumhydrogen - Sulfit verhindert, der allen Puffersystemen zur Zellkernisolierung, Chromatinpräparation und Chromatindissoziation zugefügt war.

Die Wiederfindung der Kerne nach differentieller Saccharose Dichtegradienten Sedimentation wurde durch DNA Messung bestimmt; sie betrug 75%.

Die Chromatinisolierung aus hochgereinigten Zellkernen erfolgte durch Waschen in saliner EDTA - Lösung. Da der Porenkomplex der inneren Zellkernmembran durch Magnesiumionen stabilisiert wird und EDTA als Komplexbildner Magnesium - ionen wegfängt, kann durch anschließende Waschung der EDTA-behandelten Zellkerne mit Trispuffer abnehmender Ionen - stärke bzw. Wasser durch Anschwellen der Nucleoprotein - fibrillen und somit durch Massenzunahme des von der inneren

Kernmembran eingeschlossenen Kernmaterials die inneren Kernmembranen zum Platzen gebracht werden und somit eine Separierung von Membranfragmenten und Chromatin erfolgen. Hochgereinigtes Chromatin ist in Abb.3 elektronenoptisch dargestellt. Charakteristisch für die Chromatinstruktur ist der perlschnurartige Aufbau (Nucleosomen), der deutlich in der Abbildung zu erkennen ist.

Die weitere Kontrolle des Reinheitsgrades der so gewonnenen Chromatinpräparation erfolgte durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums. Das in Abb.4 dargestellte Absorptionsspektrum hochgereinigten Chromatins aus Rattenleber zeigt einen für Chromatin charakteristischen Verlauf zwischen 220 und 320 nm.

## 3.1 Zweistufen - Dissoziation von Rattenleberchromatin

Durch differentielle Dissoziation wurde Chromatin in chromosomale Proteine und DNA separiert, wobei veränderliche Parameter der Dissoziationsbedingungen die Art des dissoziierenden Ions, die unterschiedliche Ionenstärke in den Chromatin Dissoziationspuffern, die Vorbehandlung des Chromatins durch Scherkräfte und Variation in den pH Werten der verwendeten Dissoziationspuffer waren. Im ersten Schritt der Proteinabschälung der Chromatin-DNA wurde ein Guanidinhydrochlorid - haltiges Puffersystem verwendet, also ein großes dissoziierendes Ion. Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß 48.3% aller chromosomalen Proteine aus Rattenleber unter diesen Bedingungen in den löslichen Überstand abdissoziieren. Nachfolgende Behandlung des teildissoziierten Chromatins durch mechanische Scherkräfte, also mechanische Zerkleinerung des Chromatinmaterials mit dem Ultra-Turrax, in Kombination mit der Unterdrückung elektrostatischer Wechselwirkungen und Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den restlichen chromosomalen Proteinen und der DNA durch hohe Elektrolytkonzentrationen (3 M NaCl) und Erhöhung des pH Wertes des Puffer -

systems führten im zweiten Dissoziationsschritt zu einer zusätzlichen Abtrennung chromosomaler Proteine von der DNA. Der im Überstand wiedergefundene prozentuale Anteil betrug 31.7 % (Tab.3). Durch die kombinierte Anwendung beider Dissoziationsstufen wurden 80 % aller chromosomalen Proteine von der Chromatin-DNA dissoziiert. Die nach jedem Dissoziationsschritt zwischengeschaltete langfristige Zentrifugation war erforderlich, um eine Kontamination des Proteinüberstandes durch Nucleinsäuren zu verhindern, da Nucleinsäuren die nachfolgende analytische Darstellung der chromosomalen Proteine durch Aggregation stören.

Die NHC - Proteine wurden von den Histonen durch Kationenaustauscher-Chromatographie an Bio-Rex 70 separiert. Die Elutionsfraktion, die an Bio-Rex nicht adsorbiert wurde, enthielt die NHC-Proteinfraktion (30 - 40 % der totalen chromosomalen Proteine), während die an Bio-Rex 70 adsorbierten Proteine die Histone bzw.stark basischen NHC - Proteine darstellen (45 - 50 % der totalen chromosomalen Proteine).

Tabelle 3

Quantitative Zusammensetzung des nativen Rattenleber - Chromatins vor und nach fraktionierter Dissoziation mit 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid und 3 M NaCl (Zweistufen-Dissoziation).

| | Kernproteine mg | % | DNA mg | RNA mg | Protein/DNA | RNA/DNA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| natives Chromatin | 68.3 | 100 | 26.17 | 2.36 | 2.61 | 0.09 |
| 0.4 M Guanidinium-hydrochlorid Diss. Überstand 1 | 32.9 | 48.3 | 2.02 | 0.42 | 16.31 | 0.21 |
| 0.4 M Gua.-Diss. Sediment | 35.4 | 51.7 | 24.13 | 1.81 | 1.47 | 0.08 |
| 3 M NaCl - Diss. Überstand 2 | 21.6 | 31.7 | 0.68 | 0.72 | 31.71 | 1.06 |
| 3 M NaCl - Diss. Sediment | 13.8 | 20.0 | 22.81 | 1.08 | 0.61 | 0.05 |

3.1.1 Analytische Darstellung der stark basischen chromosomalen Proteine (nach Subramanian 58,59)

Die analytische Darstellung der stark basischen an Bio-Rex adsorbierten chromosomalen Proteine(einschl. der Histonfraktion) erfolgte in einer zweidimensionalen Gel - Elektrophorese - Apparatur modifiziert nach Kaltschmidt und Wittmann (56).

Die Auftrennung erfolgte unter den Bedingungen nach Subramanian in harnstoffhaltigen Gelen bei pH 5.0 . Wie Abb. 5 zeigt, sind mit dieser Methode nach dem ersten Dissoziationsschritt 22 stark basische Proteinkomponenten zusammen mit den Histonhauptfraktionen darstellbar.Nach dem zweiten Dissoziationsschritt können 15, Coomassie anfärbbare Proteinkomponenten im Gel identifiziert werden.

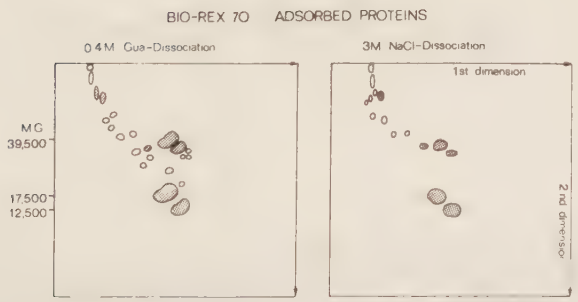



Abb. 5
Zweidimensionale Gelelektrophorese der nach 2 Stufen - Dissoziation gewonnenen basischen chromosomalen Proteine (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

### 3.1.2 Präparativ und analytische Darstellung der sauren Nichthiston-chromosomalen Proteine

Die an Bio-Rex nicht adsorbierten mit dem Äquilibrierungspuffer von der Bio Rex Säule histonfrei eluierten sogenannten sauren Nichthiston-chromosomalen Kernproteine wurden einer Isoelektrofokussierung in der Zonenkonvektionselektrophorese-Apparatur nach Valmet unterworfen. Diese Methode kombiniert zwei Vorteile:

1) ein hohes Auflösungsvermögen
2) eine hohe Beladungskapazität

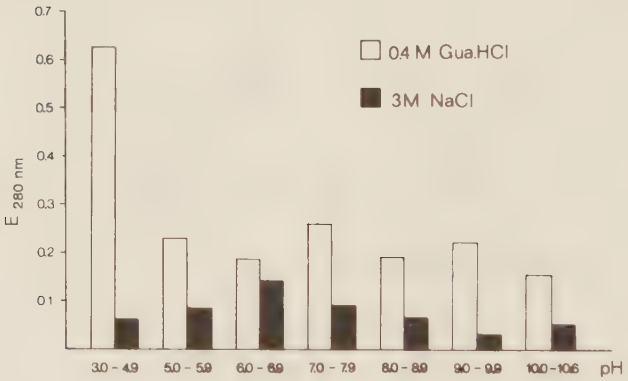



Abb. 6
Isoelektrofokussierungsdiagramm von sauren an Bio-Rex nicht adsorbierten Nichthiston-chromosomalen Proteinen. Die Isoelektrofokussierung erfolgte in der Zonenkovektionselektrophorese Apparatur nach Valmet (51) in einer line - aren pH-Gradiente (pH 3 - 10).

Die Ergebnisse (Abb.6) zeigen für den ersten Dissoziationsschritt (0.4 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff) ein quantitatives Maximum zwischen pH 4.2 und 5.8, für den zweiten Dissoziationsschritt (3 M NaCl, 6 M Harnstoff) zwischen pH 5.1 und 5.8.

Die Auftrennung der nach Isoelektrofokussierung gewonnenen Proteinfraktionen mit Hilfe der hochsensitiven Mikrogelelektrophoresetechnik, die die Analyse von 1 bis 2 ug Protein pro Gel erlaubt, demonstriert, daß mit dieser Technik ein heterogen zusammengesetztes Muster chromosomaler Proteinkomponenten darstellbar ist (Abb.7).

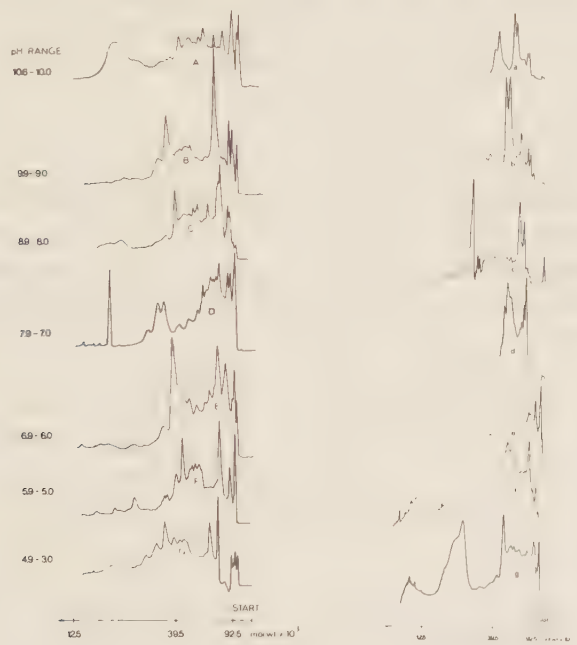



Abb.7
Densitometrische Auswertung der durch Isoelektrofokussierung vorfraktionierten sauren Nichthiston-chromosomalen Proteine (siehe Abb.6), die durch Mikrogradienten-Gel - elektrophorese aufgetrennt wurden.
A - G 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid Dissoziation
a - g 3 M NaCl Dissoziation

Die Nichthiston chromosomalen Proteinkomponenten überstreichen einen breiten Molekulargewichtsbereich; er reicht von höher als 90 000, über einen mittleren Molekulargewichtsbereich zwischen 90 000 und 40 000 bis zu einem Molekulargewichtsbereich von kleiner als 40 000 bis ca 5 000. Polypeptide mit einem Molekulargewicht weniger als 5000 treten über die Elektrophoresedauer aus dem Gel aus, wie durch Elektrophorese von Insulin gezeigt werden konnte. Insgesamt konnten über einen IP Bereich von pH 1.8 bis 10.6 in der Summe 175 Nichthistone chromosomale Proteinkomponenten - durch Coomassie Blue anfärbbar, dargestellt werden. 30 Nicht - histone chromosomale Proteinkomponenten haben ein MG größer als 90 000, 105 ein MG zwischen 40 000 und 90 000 und 40 sind in einem MG kleiner als 40 000 angesiedelt. In dem schmalen IP Bereich zwischen 5.1 bis 5.9, in dem 6.8% der 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid dissoziierten Proteine fokussierten, ist die Heterogenität mit 20 Proteinkomponenten am größten. Für die 3 M NaCl dissoziierten Proteine wurde die größte Heterogenität mit 16 Proteinkomponenten im IP Bereich zwischen 9.1 und 9.9 beobachtet.

## 3.2 3 Stufen Dissoziation von nativem Chromatin als Screening Verfahren zur Darstellung der Hetero - genität chromosomaler Proteine.

Das im folgenden beschriebene Verfahren stellt eine einfach zu handhabende und schnell durchzuführende Mikro - methode zur hochauflösenden Charakterisierung "saurer" und "basischer" chromosomaler Proteine mit gelelektro - phoretischen Trennverfahren dar und ist somit eine Ergänzung zu der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Methode, die im Endschritt auf der Kombination von präparativer isoelektrischer Fokussierung und anschließender Gelelektrophorese fußt.

Der methodische Ablauf ist kurz zusammengefaßt folgender:

Die nach 3 Stufen Dissoziation (1.Stufe:0.4 M Guani - nidiniumhydrochlorid, 2.Stufe: 3 M NaCl, 3.Stufe: 2 M Guanidinrhodanid) in den Überstand abgelösten chromosomalen Proteine wurden über Bio-Rex 70 zur Separierung in saure und basische chromosomale Proteine chromatographiert. Anschließend wird die nach jedem Dissoziationsschritt isoliert gewonnene saure chromo - somale Proteinklasse (mit dem Elutionspuffer aus der Bio Rex Säule eluiert) einer Mikrogelelektrophorese nach SDS Beladung der Proteine unterworfen. Die stark basischen chromosomalen Proteine werden nach Subramanian in der zweidimensionalen Mikrogelelektrophorese getrennt. Der Vorteil dieser Methode ist vor allem darin begründet, daß bei Einsatz von 1 - 2 ug Protein/Gel für die Mikrogelelektrophorese bzw. 10 ug Protein/Slabgel für die zweidimensionale Mikrogelelektrophorese ein im Vergleich zu anderen Elektrophoreseverfahren bisher nicht erreichte hochauflösende Trennschärfe erreicht wird. Einschränkend muß bemerkt werden, daß bei der Mikro-

gradientengelelektrophorese niedermolekulare Proteine (MG kleiner als 5000) unter den angegebenen experimentellen Bedingungen nicht mit Sicherheit erfaßt werden können, weil sie durch nicht ausreichenden Vernetzungsgrad über die Dauer der Elektrophorese in den Puffer - raum austreten können.

Die quantitative Verteilung der Chromatinbestandteile Protein, DNA und RNA nach 3 Stufen Dissoziation von nativem Rattenleberchromatin ist in Tab.4 zusammengefaßt. Mit Hilfe der 3 Stufen Dissoziation können bis zu 97.9 % der an Chromatin DNA gebundenen chromosomalen Proteine in den Überstand abgelöst werden.

Tabelle 4

Quantitative Zusammensetzung des nativen Rattenleber Chromatins vor und nach fraktionierter Dissoziation mit 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid, 3 M NaCl bzw. 2 M Guanidinrhodanid.

| | Kernproteine mg | % | DNA mg | RNA mg | Protein/DNA | RNA/DNA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Chromatin | 31.67 | 100 | 11.9 | 1.11 | 2.66 | 0.09 |
| 0.4 M Guanidinium-hydrochlorid Diss. Überstand 1 | 13.72 | 43.3 | 0.9 | 0.22 | 15.24 | 0.24 |
| 0.4 M Gua.-Diss. Sediment | 17.95 | 56.7 | 11.0 | 0.89 | 1.63 | 0.08 |
| 3 M NaCl - Diss. Überstand 2 | 9.19 | 29.0 | 0.3 | 0.21 | 30.63 | 0.7 |
| 3 M NaCl - Diss. Sediment | 8.76 | 27.7 | 10.7 | 0.68 | 0.82 | 0.06 |
| 2 M Gua. - Rhodanid Überstand 3 | 8.12 | 25.6 | -- | 0.15 | --- | --- |
| 2 M Gua. - Rhodanid Sediment | 0.64 | 2.0 | 10.4 | 0.53 | 0.06 | 0.05 |
| abdiss.Prot.gesamt | | 97.9 | | | | |

In den Abbildungen 8 und 9 sind die zur Darstellung der Proteinkomponenten mit Coomassie Blue angefärbten Mikrogradientengele bzw. die densitografische Auswertung dieser Gele dargestellt. In der Summe konnten über einen Molekulargewichtsbereich von 5000 bis über 90 000 ca 141 Nichthistone-chromosomale Proteinkomponenten nachgewiesen werden. Die durch 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid Puffer in den Überstand abgelösten Proteine konnten in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 10 000 und 100 000 (Dalton) in ca 67 Banden aufgetrennt werden, während die 45 Banden der 3 M NaCl Dissoziationsstufe überwiegend im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 000 und 50 000 (Dalton) visuell nachweisbar sind. Die nach 2 M Guanidiniumrhodanid Puffer Behandlung abdissoziierten sauren Nichthiston chromosomalen Proteine lagen in der Größenordnung von 29 Proteinbanden und waren ausschließlich im hoch - molekularen Bereich zwischen 50 000 und 100 000 (Dalton) darstellbar.

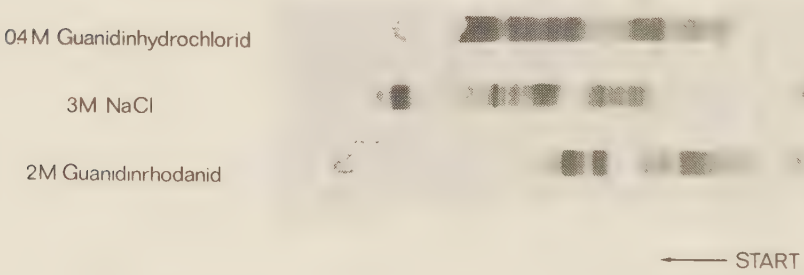



Abb.: 8
Mikrogelelektrophorese im kontinuierlichen Mikrogel - gradienten(1.2 - 40%) von differentiell dissoziierten Rattenleber NHC-Proteinen (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

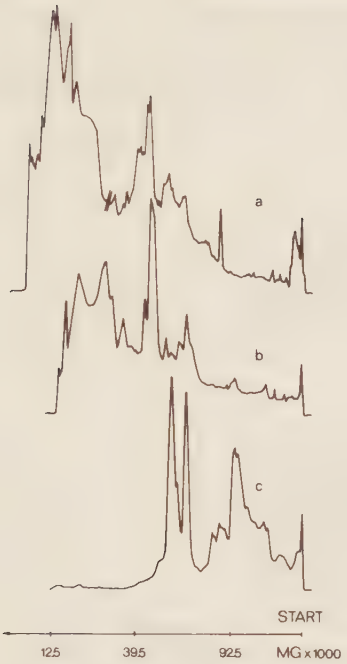



Abb.: 9
Densitometrie der nach 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid Dissoziation, 3 M NaCl Dissoziation und 2 M Guanidinrhodanid Dissoziation an kontinuierlichen Mikrogelgradienten auf - getrennten NHC - Proteine (siehe Abb.8; Gilford Spektral Densitometer Modell 24 009; Einzelheiten siehe Material und Methoden)

Zur Separierung der stark basischen chromosomalen Proteinfraktionen, die nach den einzelnen Dissoziationsschritten fraktioniert gewonnen wurden, kam ein zweidimensionales Mikrogelelektrophoreseverfahren zur Anwendung. Insgesamt konnten mit dieser Methode ca 21 stark basische chromosomale Proteine einschließlich der Histon Hauptkomponenten visuell nachgewiesen werden.

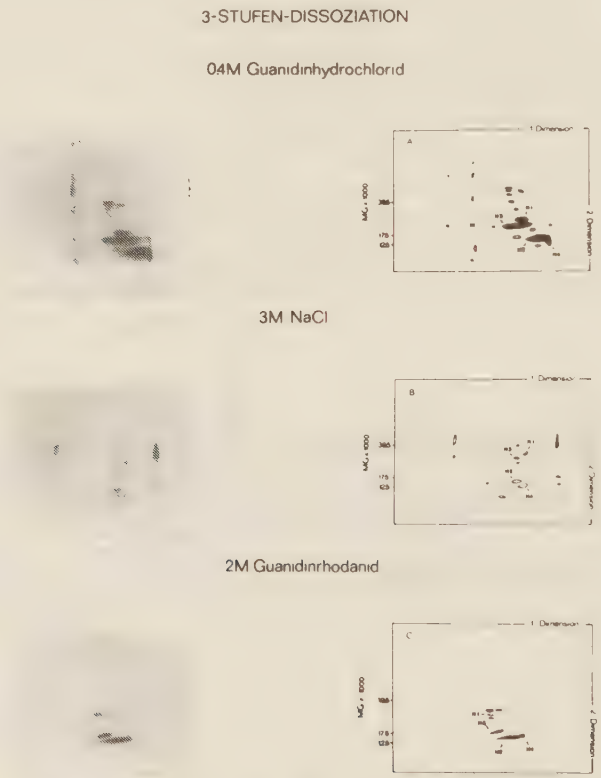



Abb.: 10
Zweidimensionale Mikrogelelektrophorese der nach 3 Stufen Dissoziation gewonnenen basischen chromosomalen Proteine (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

## 3.3 Charakterisierung chromosomaler Proteine aus Nucleosomenpräparation

Die Nucleosomenpräparation erfolgte durch Nucleasebehandlung intakter hochgereinigter Zellkerne nach der Methode von Hewish und Burgoyne (47), die Reindarstellung von Mononucleosomen des nucleasebehandelten Kernmaterials über einen Saccharose Dichtegradienten. Die Abb.11 zeigt ein typisches Sedimentationsprofil nucleasebehandelter Zellkerne.

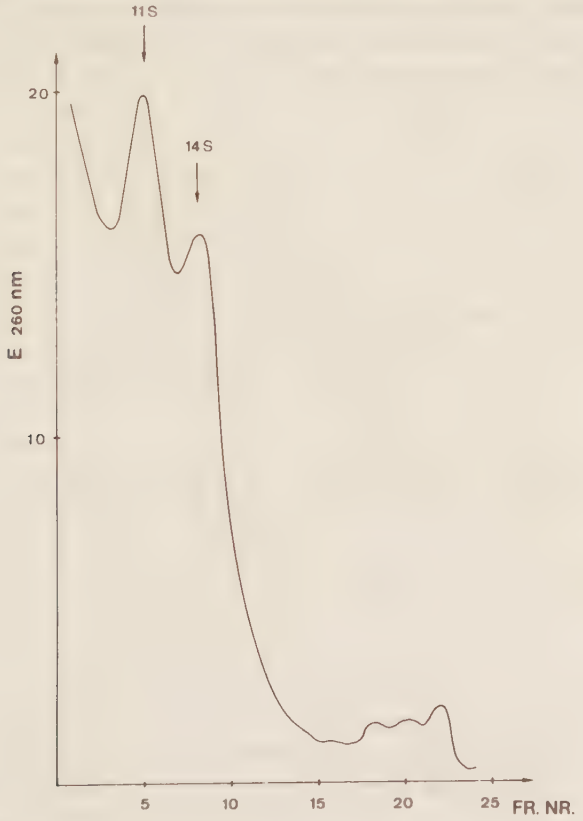



Abb.11
Saccharose Gradienten Zentrifugation von Chromatin nach Behandlung der Kernsuspension mit Micrococcal Nuclease (20 U/g Gewebe; Einzelheiten siehe Material und Methoden).

In der Startregion liegen durch Nucleasebehandlung freigesetzte chromosomale Proteine und niedrig molekulare Nucleotide. Die im 11 S Bereich sedimentierende Fraktion repräsentiert die monomeren Nucleosomen, die mit höherem S - Wert sedimentierenden Fraktionen sind Vielfache der monomeren Nucleosomen.

Die Auftrennung durch Saccharose Gradientenzentrifugation isolierter Mono-Nucleosomen durch Isoelektro - fokussierung in der Zonenkonvektions-Apparatur nach Valmet führt zu einem heterogenen Verteilungsspektrum (Abb.12) in unterschiedlichen pH Bereichen präzipitierender Mono-Nucleosomen.

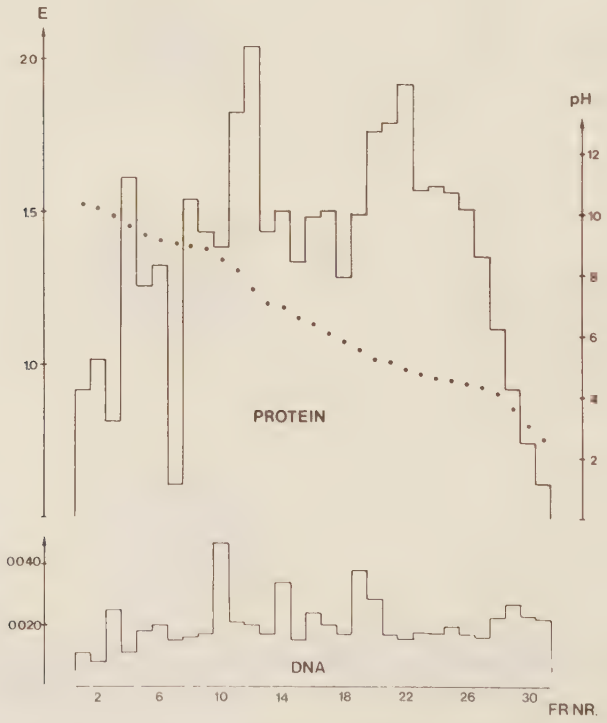



Abb. 12
Isoelektrofokussierungsdiagramm von undissoziierten Mononucleosomen. Ca 100 mg Nucleosomensuspension wurden auf die Valmet Apparatur aufgegeben und im präparativen Maß - stab isoelektrisch fokussiert (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

Die mengenmäßigen Maxima der fokussierten Nucleosomen liegen im pH Bereich zwischen 5 und 5.5 und 7 und 8.5. Möglicherweise repräsentiert das im sauren Bereich liegende quantitative Maximum das aus Histonen und ungeladener DNA sich zusammensetzende Nucleosomen-Core, während in dem im basischen Bereich sich darstellenden Maximum möglicherweise Histonpartikel mit überlappenden negativ geladenen DNA Resten fokussieren. Das DNA Verteilungsdiagramm über die pH Gradiente unterstützt diese Vermutung.

Dissoziation von Mono - Nucleosomen in Nucleosomen DNA und nucleosomengebundene chromosomale Proteine durch einen kombinierten Angriff aus 6 M Harnstoff, 04 M Guanidiniumhydrochlorid und 3 M NaCl führten unter diesen Pufferbedingungen zu einer Ablösung von 94.8% der an Mono-Nucleosomen gebundenen Proteine. Die so gewonnenen Mono-Nucleosomen Proteine wurden ohne vorherige Separierung in Histone und Nichthistone-chromosomale Proteine als Gesamtfraktion isoelektrophoretisch getrennt. Abb. 13 gibt repräsentativ ein Isoelektrofokussierungsdiagramm der von den Nucleosomen abdissoziierten chromosomalen Proteine wieder. Das mengenmäßige Maximum liegt im pH Bereich zwischen 4.1 und 4.9 .

Die in den verschiedenen pH Bereichen der linearen pH Gradiente nach Isoelektrofokussierung präzipitierenden Proteinkomponenten wurden anschließend einer Mikrogra - dientenelektrophorese unterworfen. Die Abbildungen 14a und 14b geben die densitografische Auswertung der Mikrogradientengele wieder. Die im stark basischen Bereich sich darstellenden Proteinkomponenten repräsentieren zum Teil die in den Nucleosomen gebundenen Histone. Über den pH Bereich von 2.0 bis 11.6 sind in der Summe 230 Proteinkomponenten nachweisbar. Mit der Methode ist es möglich, neben den stark basischen Histonkomponenten ein breites Spektrum Nichthistoner chromosomaler Pro - teine, der durch unterschiedlichen pH Wert und Molekulargewichte charakterisiert sind, darzustellen.

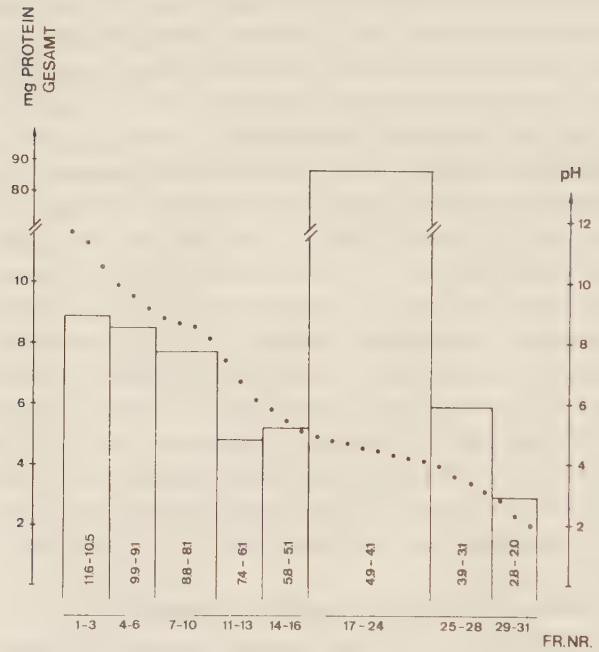



Abb. 13
Isoelektrofokussierungsdiagramm der von den Nucleosomen abdissoziierten NHC - Proteine. Die Mononucleosomen wurden mit 6 M Harnstoff, 0.4 M Guanidiniumhydrochlorid und 3 M NaCl dissoziiert, für 48 Stunden bei 183 400 x g zentrifugiert und die Proteine des Überstandes in der Valmet Apparatur isoelektrisch fokussiert.

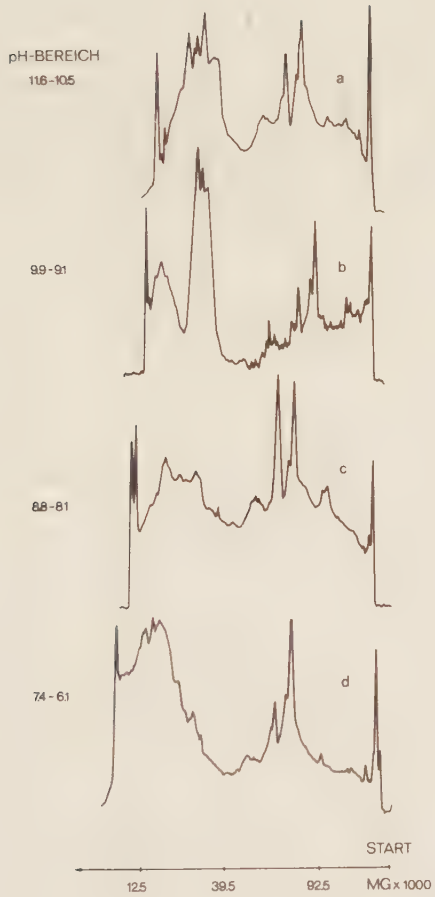



Abb. 14 a
Densitometrie der durch Isoelektrofokussierung in der Valmet Apparatur (siehe Abb.13) vorfraktionierten chromosomalen Mononucleosomen (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

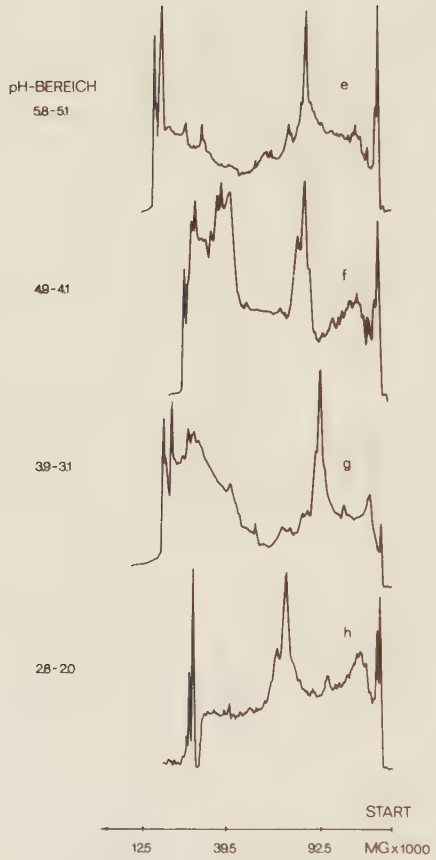



Abb. 14 b
Densitometrie von chromosomalen Mononucleosomen (siehe Abb. 14a)

Die nach Saccharose Dichtegradientenzentrifugation nucleasebehandelten Zellkernmaterials im Startbereich sedimentierenden Proteine(siehe Abb.11) wurden iso - elektrisch aufgetrennt. Die Verteilung der Proteine über die pH Gradiente ist in Abb. 15 dargestellt. Die Hauptmenge der Proteine fokussierte im pH Bereich zwischen 6.2 und 7.4. Ferner stellt sich ein quantitatives Maximum im basischen Bereich zwischen pH 9 und 9.8 dar.

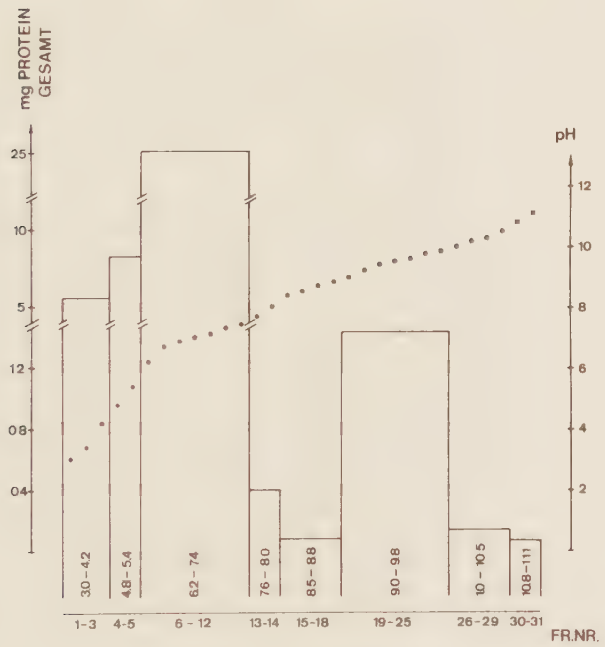



Abb. 15
Isoelektrofokussierungsdiagramm der nach Saccharose Gradientenzentrifugation im Startbereich sedimentierenden chromosomalen Proteine (siehe Abb.11) aus Ratten - leber.

Die Auftrennung der nach unterschiedlichen isoelektrischen Punkten fraktioniert dargestellten Proteingesamtfraktion über Mikrogradientengele führte zur Darstellung von ca 250 Proteinkomponenten einschließlich der stark basischen Histonfraktion (Abb.16, 17a,b). Im schmalen IP Bereich zwischen 6.2 und 7.4, in dem 87% der dissoziierten Proteine fokussieren, ist die Heterogenität mit 47 Banden am größten. Die Molekulargewichte der fokussierten Proteinkomponenten streuen zwischen 8000 und über 90 000.

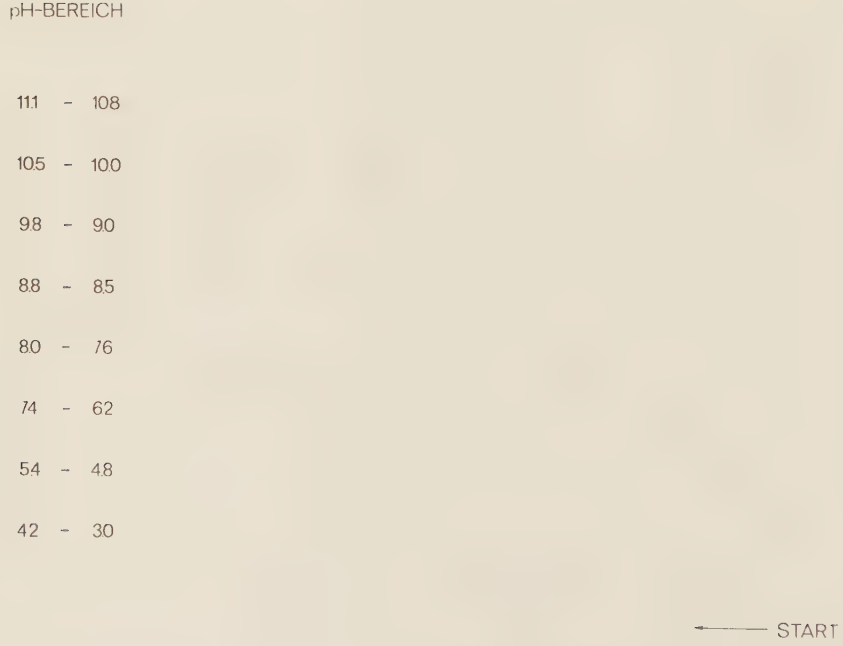



Abb. 16
Mikrogelelektrophorese der in der Valmet Apparatur (siehe Abb.15) vorfraktionierten chromosomalen Proteine.

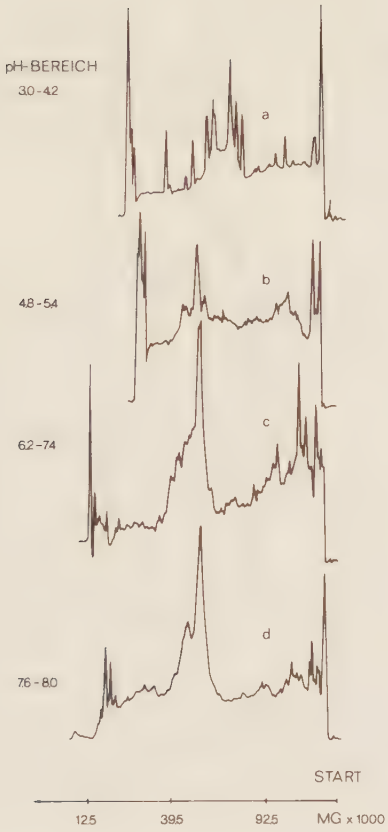



Abb. 17 a
Densitometrische Auswertung der in Abb.16 dargestellten chromosomalen Proteine (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

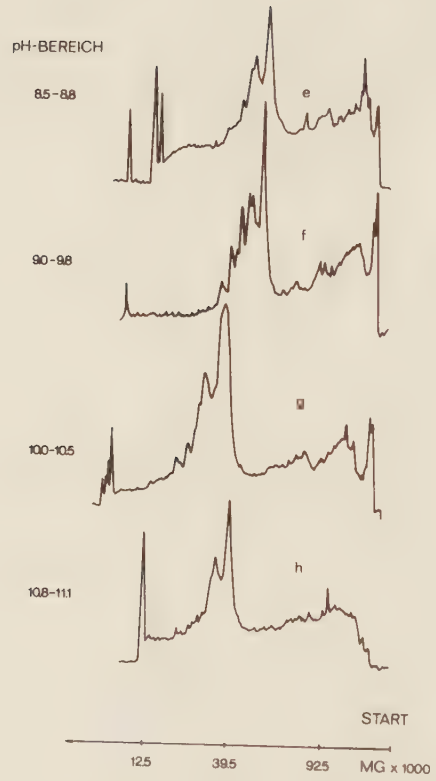



Abb. 17 b
Densitometrische Auswertung der in Abb.16 dargestellten chromosomalen Proteine (Einzelheiten siehe Material und Methoden).

## 3.4 Elektrophoretische Charakterisierung nucleoplasmatischer Proteine

Die wie im methodischen Teil beschrieben, nach Lyse der inneren Kernmembran hochgereinigter Zellkerne gewonnene Nucleoplasmafraktion wurde isoelektrofokussiert (Abb.18). Im basischen Bereich zwischen pH 9 und 10.4 und im sauren Bereich zwischen 4.1 und 5.1 präzipitierte die Hauptmenge der nucleoplasmatischen Proteine.

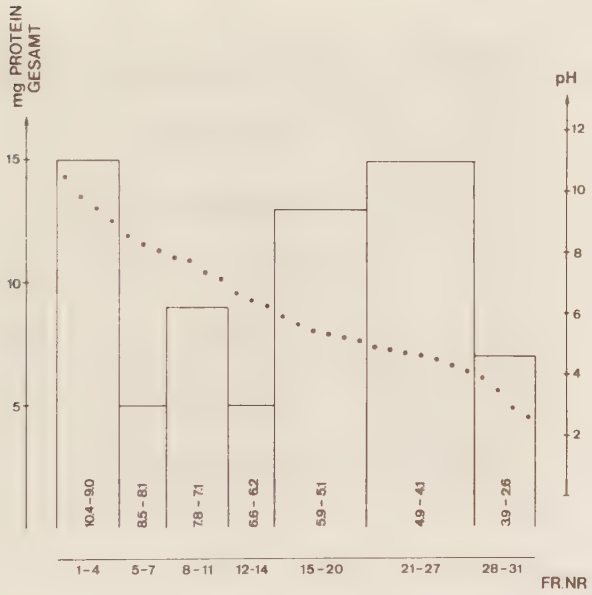



Abb. 18

Isoelektrofokussierungsdiagramm nucleoplasmatischer Proteine aus Rattenleber (Einzelheiten siehe Material und Methoden)

Analyse der 7 durch unterschiedliche IP Bereiche charakterisierten nucleoplasmatischen Proteine durch Mikrogradientengelelektrophorese führt in der Summe zu 240 Proteinkomponenten, die visuell und durch Densitographie darstellbar sind (Abb.19,20). Der Hauptteil der Proteinkomponenten war lokalisiert in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 25 000 und 100 000.

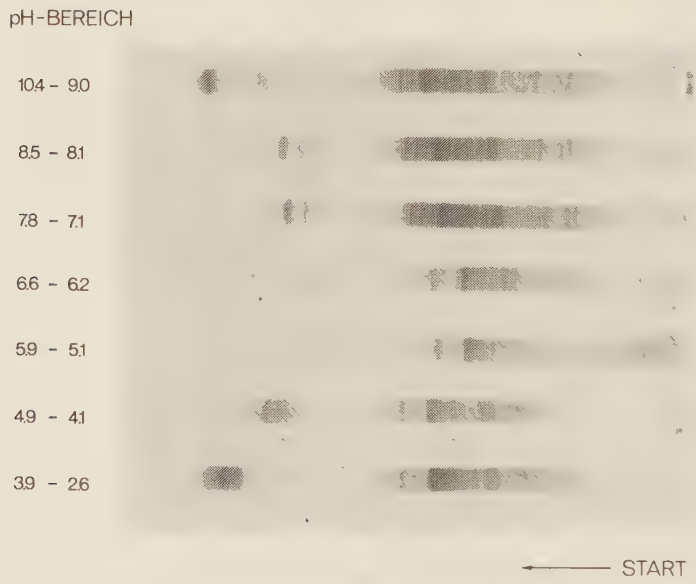



Abb. 19

Mikrogelelektrophorese nucleoplasmatischer Proteine nach Vorfraktionierung durch Isoelektrofokussierung in der Valmet Apparatur (siehe Abb.18)

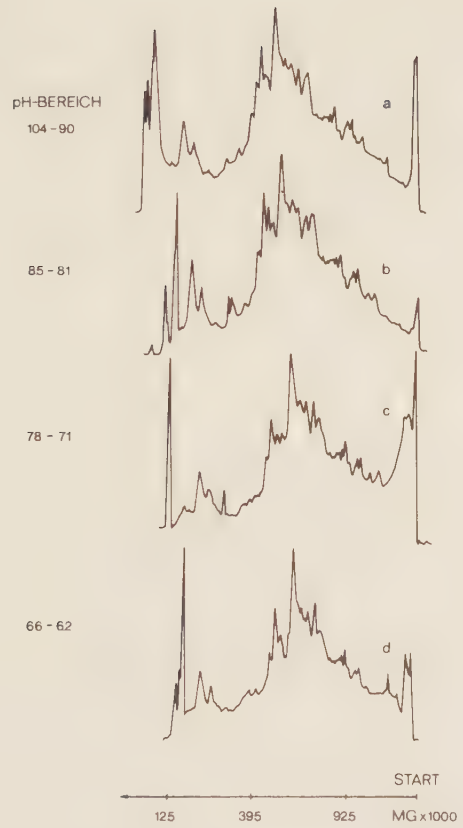



Abb. 20 a

Densitometrische Auswertung der vorfraktionierten nucleoplasmatischen Proteine (siehe Abb. 19)

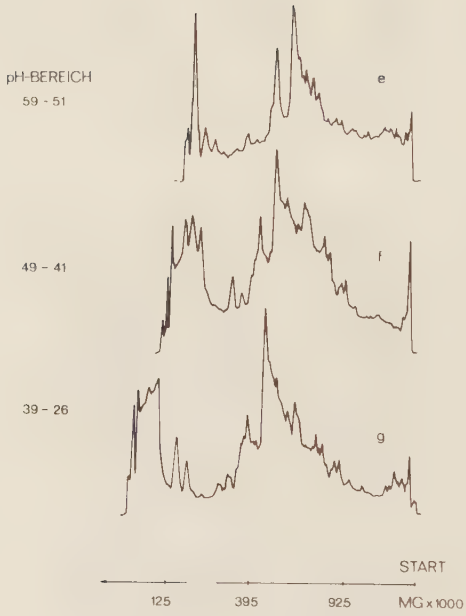



Abb. 20 b
Densitometrische Auswertung der vorfraktionierten nucleoplasmatischen Proteine (siehe Abb. 19)

## 3.5 Charakterisierung cytoplasmatischer Proteine aus Rattenleber durch elektrophoretische Trennverfahren.

Um eine Aussage über den Kontaminationsgrad der Kern - proteinfraktion durch cytoplasmatische Anteile treffen zu können, ist es notwendig die cytoplasmatischen Proteine mit den gleichen Methoden wie für die Kernproteine zu analysieren. Der 105 000 x g Überstand (Cytoplasmafraktion) wurde in einer linearen pH Gradiente in der Zonenkonvektions Isoelektrofokussierungsapparatur nach Valmet isoelektrofokussiert (Abb.21).

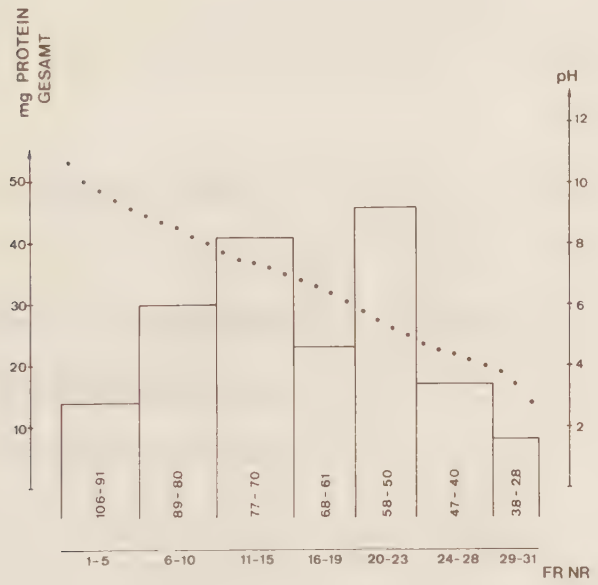



Abb.21
Isoelektrofokussierungsdiagramm cytoplasmatischer Proteine aus Rattenleber. Entsprechend der Vorschrift von Blobel und Potter (46) wurden die Zellkerne isoliert. Der dabei anfallende 850 x g Überstand wurde in einem kontinuierlichen pH Gradienten (pH 3.5-10) zur Gewinnung der Cytoplasmafraktion für 60 Minuten bei 105 000 x g zentrifugiert und die Proteine dieses Überstandes in der Valmet Apparatur isoelektrofokussiert.

Die mengenmäßigen Maxima lagen in den pH Bereichen zwischen 5 und 5.8 sowie 7 und 7.7 (Abbildung 22,23a,b). Die in 7 IP Bereichen zusammengefaßten cytoplasmatischen Proteine wurden nachfolgend elektropherographiert über Mikrogradientengele nach SDS Beladung. Insgesamt konnten mit dieser Methode 260 Proteinkomponenten im pH Bereich zwischen 2.8 und 10.6 visuell und durch densitometrische Auswertung erfaßt werden. Die größte Bandenzahl war in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 10 000 und 60 000 lokalisiert.

Übereinstimmung in den elektropherographisch ermittelten Proteinmustern sowohl nach Isoelektrofokussierung als auch nach Mikrogradientengelelektrophorese zwischen den cytoplasmatischen Proteinen und den Kernproteinen (Nucleoplasma, chromosomale Proteine) wurden nicht beobachtet.

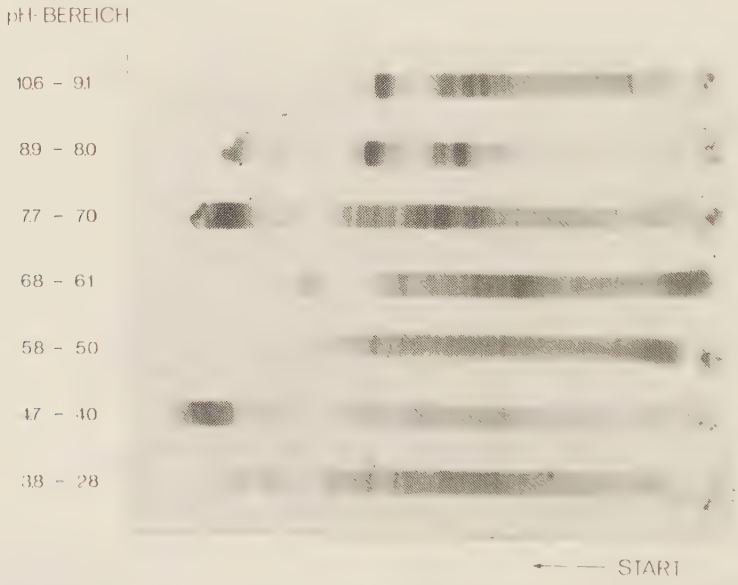



Abb. 22
Mikrogelelektrophorese der durch Isoelektrofokussierung vorfraktionierten cytoplasmatischen Proteine aus Rattenleber.

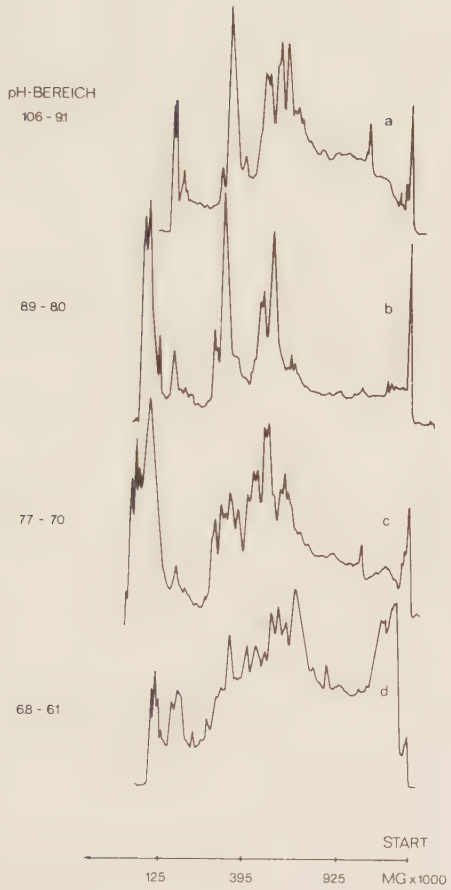



Abb. 23 a
Densitometrische Auswertung der im Elektropherogramm dargestellten (Abb.22) cytoplasmatischen Proteine.

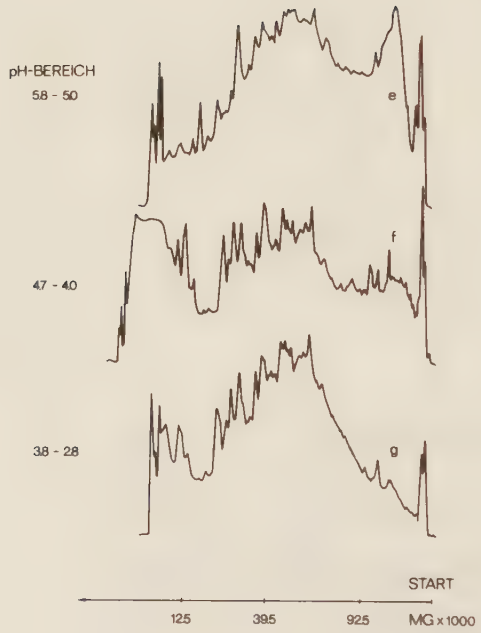



Abb. 23 b
Densitometrische Auswertung der im Elektropherogramm (Abb.22) dargestellten cytoplasmatischen Proteine.

## 4 Diskussion

Seit den Beobachtungen von Stedman und Stedman (64), daß Histone die Eigenschaften von Genrepressoren haben können, wurden zahlreiche Experimente durchgeführt, um diese Hinweise zu bestätigen. Allfrey et al. (65) haben gezeigt, daß das Entfernen der Histone aus dem Chromatin die Template Aktivität für die RNA Synthese in vitro erhöht. Umgekehrt erniedrigte die Bindung von Histonen an freie DNA die Matrizenaktivität erheblich (66). Jedoch konnten zwischen Histonen unterschiedlicher Zelltypen und aus dem gleichen Gewebe unterschiedlicher Arten nur sehr geringe Unterschiede festgestellt werden. Somit weisen die Histone nicht die Heterogenität oder Gewebespezifität, die man von Proteinen erwartet, die in die Regulation der Genexpression involviert sind, auf. Ihre relative Konstanz zwischen verschiedenen Zelltypen und unter verschiedenen physiologischen Bedingungen lassen die Schlußfolgerung zu, daß Histone nicht an der Regulation der Genaktivität beteiligt sind (67). Andererseits waren Nichthiston-chromosomale Proteine (NHC-Proteine) unterschiedlichen Ursprungs außerordentlich he - terogen und variabel, um selektiv an DNA zu binden und die Transkription von isolierter DNA bzw. von Chromatin zu stimulieren. Diese Beobachtungen, unterstützt durch Chromatin-Rekonstitutionsexperimente, können als Hinweis dafür ge - wertet werden, daß NHC-Proteine regulatorische Funktion in der Transkription und Genexpression ausüben (67 - 69).

Mirsky und Pollister (70) berichteten als erste von sauren NHC-Proteinen im Chromatin und ihrer Solubilisierung mit 1 M NaCl. Die NHC-Proteine konnten partiell von DNA und Histonen durch Präzipitation mit 0.14 M NaCl separiert werden. Erste Versuche, NHC-Proteine zu isolieren und fraktionieren, gehen auf die Experimente von Wang (71,72) zurück, der den Kernrückstand nach Extraktion mit 1 M NaCl analysierte und weiter durch Veränderung des pH-Wertes und Ammonium-

sulfatfällungen fraktionierte.

Bonner et al. (73) führten für ihre Dissoziations- und Rekonstitutions Versuche an Chromatin den Gebrauch von 2 M NaCl in Verbindung mit 5 M Harnstoff ein. Von da an wurde eine Vielzahl von Methoden für die Isolierung und Charakterisierung von NHC-Proteinen entwickelt. Chromatin konnte hierfür durch unterschiedliche Salzlösungen (74 - 84) in Gegenwart oder Abwesenheit von Harnstoff disso - ziiert werden und die Proteine weiter durch Chromatographie an QAE - Sephadex A - 50 (85,86), Bio-Rex 70 (76,87) oder DEAE Cellulose (76) fraktioniert werden.

Der Nachweis, daß NHC-Proteine heterogen sind, veranlaßte verschiedene Forschergruppen, diese Proteine durch Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese aufzutrennen, indem sie Elektrophorese in Säure Harnstoff (88) oder isoelektrische Fokussierung in Acrylamidgelen (89 - 91) mit SDS Gelelektrophorese kombinierten. Diese Techniken zeigten, daß NHC-Proteine aus Chromatin von unterschiedlichen Geweben in ihren Isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten über einen weiten Bereich streuen.

Mit Hilfe dieser analytischen Trennverfahren konnten 50 - 60 (89 - 92) bzw. 70 - 80 (88) und 100 (93) Coomassie anfärbbare Proteinkomponenten dargestellt werden. Peterson und Conkey (94) berichteten über die $^{35}$ S Methionin Markierung von Zellproteinen, die sie durch Zweidimensionale Gelelektrophoresen auftrennten und autoradiographisch in 450 NHC-Proteinkomponenten erfassen konnten. Krüger (95) konnte mit seiner Kombination von präparativen und ana - lytischen Fraktionierungsmethoden 470 verschiedene Proteinkomponenten aus Kuheuter nachweisen. In Anlehnung an diese Methode gelang mir in meiner Diplomarbeit die Darstellung von 175 NHC - Proteinen aus Rattenleber.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine einfache und zeitsparende Methode im Mikromaßstab für die Darstellung der

Heterogenität von NHC-Proteinen gefunden werden. Hierfür wurde Rattenleberchromatin stufenweise mit Puffern hoher Salz- und Harnstoffkonzentrationen dissoziiert und nach Abtrennen der DNA konnten die NHC-Proteine durch SDS - Mikrogelelektrophorese nach Neuhoff (52-55) in 141 Komponenten separiert werden.

Die elektrophoretische Charakterisierung der stark basischen chromosomalen Proteine erfolgte durch zwei - dimensionale Mikro-Plattengelelektrophorese nach Ventimiglia et al. (56,57). Insgesamt konnten 21 Coomassie anfärbbare Proteinkomponenten nachgewiesen werden.

Die in den Abbildungen 8, 16, 19 und 22 dargestellte Heterogenität der NHC - Proteine mag bis zu einem gewissen Grade von der Konzentration des Detergenz, das für ihre Extraktion erforderlich war, abhängen. Marushige et al. (96) isolierten beispielsweise eine NHC-Proteinfraktion von Rattenleberchromatin, um durch Sedimentationsexperimente diese Fraktion weiter zu analysieren und die Wirkung von SDS auf dieses Protein zu ermitteln. In 0.1 % SDS war das durchschnittliche Molekulargewicht 14 300 Dalton; geringere SDS Konzentrationen ließen die Proteinfraktion aggregieren und das Molekulargewicht erreichte eine Größenordnung von 100 000 Dalton.

Die Zahl und der Typ der NHC-Proteine kann ebenso mit den Isolierungs- und Fraktionierungsmethoden (97) variieren. Da elektrophoretische Trennverfahren in SDS enthaltenden Acrylamid Gelsystemen nach der Molekülgröße und nicht nach der Veränderung von Proteinen trennen, enthalten Polypeptide von ähnlicher elektrophoretischer Mobilität möglicherweise beliebige Proteinarten von identischem oder sehr ähnlichem Molekulargewicht. Da SDS jedoch ein stark dissoziierendes Agens ist, repräsentieren wahrscheinlich einige Polypeptidbanden in den Gelen indi-

viduelle Untereinheiten eines nativen Proteins. Deshalb ist bei der Interpretation von heterogenen NHC-Protein Gelpattern größte Vorsicht angebracht, insbesonders dann, wenn die Gelelektrophorese in Gegenwart von niedrigen Detergenz Konzentrationen durchgeführt wurde.

Zur enormen Heterogenität von NHC-Proteinen tragen sicherlich auch zahlreiche Enzyme des Zellkerns bei, die als DNA Polymerasen und Ligasen in die DNA Synthese und Re - paratur involviert sind (98 - 100), als RNA Polymerasen an der RNA Transkription beteiligt (101) sind, Proteasen die den Auf- und Abbau von Proteinen steuern (102 - 104) und Enzyme, die für die Modifikation von Nukleinsäuren und Proteinen verantwortlich sind (Methylasen, Acetylasen, Phosphokinasen, Phophatasen etc.). Da einige NHC Proteinkomponenten als Actin bzw. Myosin (105,106) identifiziert werden konnten, spricht man dieser Fraktion neben enzy - matischen auch strukturelle Funktionen zu.

Darüberhinaus muß diskutiert werden, daß eine überlappende Proteinabschälung durch die differentielle Dissoziation nicht ganz auszuschließen ist. Das würde bedeuten, daß sich das Bandenmuster z.B. der 3 - Stufen Dissoziation in den korrespondierenden IP Bereichen als gleichartig darstellen würde. Vergleicht man jedoch die einzelnen Bereiche, so findet man ein völlig verschiedenes Bandenmuster.

Zusammenfassend können folgende Vorteile, der in dieser Arbeit zur Isolierung und elektrophoretischen Charakterisierung von chromosomalen Proteinen angewandten Methoden, hervorgehoben werden:

1) Fraktionierung von Chromatin durch stufenweise Disso - ziation mit Puffern hoher Salz- und Harnstoffkonzen - trationen. Unter diesen Bedingungen erhält man eine hohe Ausbeute an löslichen Proteinen und vermeidet extreme pH Bedingungen. Außerdem läßt sich die Methode einfach und zeitsparend durchführen.

2) Abtrennung der DNA durch Ultrazentrifugation und Darstellung der Heterogenität von NHC Proteinen durch SDS Mikrogelelektrophorese nach Neuhoff (52 - 55)

3) Elektrophoretische Auftrennung der stark basischen chromosomalen Proteine durch zweidimensionale Mikro-Plattengelelektrophorese nach Ventimiglia et al.(56,57)

4) Fraktionierung der NHC-Proteine von Chromatinsubfraktionen (Nucleosomen) und Zellkompartimenten (Cyto - plasma, Nucleoplasma) im präparativen Maßstab durch Isoelektrofokussierung in der Valmet Apparatur und elektrophoretische Separierung durch SDS Mikrogel - elektrophorese nach Neuhoff (52 - 55).

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Auftrennung chromosomaler aus nativem Rattenleberchromatin sowie präparativ dargestellten Nucleosomen mit Hilfe präparativer und analytischer Methoden. Folgende methodische Einzelschritte wurden durchgeführt:

1) Darstellung hochgereinigter Zellkerne aus Leberzellhomogenat durch Zentrifugation über hyperosmolare Saccharose Dichtegradienten und Triton X-100 Behandlung.
2) Präparation nativen Chromatins aus hochgereinigten Zellkernen durch Saline-EDTA Waschung und sukzessive Erniedrigung der Ionenstärke des Puffermilieus.
3) Präparation von Mononucleosomen erfolgte nach der Methode von Hewish und Burgoyne (47) durch Inkubation des hochgereinigten Kernsediments mit Micrococcal Nuclease und anschließende Saccharose Dichtegradienten Zentrifugation.
4) Durch differentielle Dissoziation wurden natives Chromatin und Mononucleosomen in chromosomale Proteine und Chromatin DNA separiert, wobei in einem Mehrschritt - prozeß veränderliche Parameter der Dissoziationsbedingungen die Art des dissoziierenden Ions, die unterschiedliche Ionenstärke in den Chromatin-Dissoziationspuffern waren, sowie die Vorbehandlung des Chromatins durch Scherkräfte und Variation in den pH Werten.
5) Die DNA wurde sorgfältig, um die stark aggregierenden Eigenschaften dieser Substanzklasse gegenüber den chromosomalen Proteinen zu unterbinden, durch hochtourige Langzeitzentrifugation von den in den Überstand abdisso - ziierten chromosomalen Proteine abgetrennt.
6) Die Separierung der NHC-Proteine von den stark basischen histonen Proteinen erfolgte durch Kationenaustausch - chromatographie an Bio-Rex 70.
7) Die NHC-Proteine wurden im präparativen Maßstab durch Isoelektrofokussierung in der Zonenkonvektionsapparatur nach Valmet (51) in einer linearen pH Gradiente (pH 3.5-10) vorfraktioniert und anschließend - nach Beladen der

Proteine mit SDS - durch Mikrogelelektrophorese nach Neuhoff (52 - 55) aufgetrennt.

8) Die stark basischen an Bio-Rex 70 adsorbierten chromoso - malen Proteine wurden durch eine Zweidimensionale Mikro- plattengelelektrophorese unter den Elektrophoresebedin - gungen nach Subramanian (58,59) getrennt.

Unter den gleichen Elektrophoresebedingungen wie für die chromosomalen Proteine, wurden die löslichen cytoplasmatischen und nucleoplasmatischen Proteine aufgetrennt, um Ähnlichkeiten in den Elektrophoresemustern auszuschließen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß mit den angewendeten Techniken eine breite Heterogenität der NHC-Proteine und der stark basischen chromosomalen Proteine aus nativem Chromatin wie aus Mononucleosomen darstellbar ist.

Die Bedeutung der Heterogenität der chromosomalen Proteine sowie deren möglicher Wirkungsmechanismus auf der Ebene der Transkription werden diskutiert.

## 6 Literaturverzeichnis

1 R.K.J.NARAYAN und H.REES:
Nuclear DNA Variation in Lathyrus
Chromosoma 54 (1976) 141 - 154

2 J.F.PARDON und M.F.H.WILKINS:
A Super-coil Model for Nucleohistone
J.Mol.Biol. 68 (1972) 115 - 124

3 J.F.PARDON, B.M.RICHARDS, L.G.SKINNER und G.H.OCKEY:
X-ray Diffraction from Isolated Metaphase Chromosomes
J.Mol.Biol. 76 (1973) 267 - 270

4 A.L.Olins und D.E.OLINS:
Spheroid Chromatin Units (v-Bodies)
Science 183 (1974) 330 - 332

5 B.SOLLNER WEBB und G.FELSENFELD:
A Comparison of the Digestion of Nuclei and Chromatin by Staphylococcal Nuclease
Biochemistry 14 (1975) 2915 - 2920

6 M.NOLL:
Internal Structure of the Chromatin Subunit
Nucl.Ac.Res. 1 (1974) 1573 - 1578

7 E.M.BRADBURY:
The Structure and Function of Chromatin
Ciba Foundation Symposium Vol.28, Scientific Publishers, Amsterdam

8 R.D.KORNBERG und J.O.THOMAS:
Chromatin Structure: Oligomers of the Histones
Science 184 (1974) 865 - 868

9 J.L.COMPTON, M.BELLARD und P.CHAMBON:
Biochemical Evidence of Variability in the DNA Repeat Length in the Chromatin of Higher Eukaryotes
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 (1976) 4382 - 4386

10 P.OUDET, M.GROSS-BELLARD und P.CHAMBON:
Electron Microscopic and Biochemical Evidence that Chromatin Structure is a Repeating Unit
Cell 4 (1975) 281 - 300

11 D.LOHR, J.CORDEN, K.TATCHELL, R.T.KOVACIC und VAN HOLDE, K.E.:
Comparative Subunit Structure of HeLa, Yeast and Chicken Erythrocyte Chromatin
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74 (1977) 79 - 83

12 M.NOLL und R.D.KORNBERG:
Action of Micrococcal Nuclease on Chromatin and the Location of Histone H1
J.Mol.Biol. 109 (1977) 393 - 404

13 J.O.THOMAS und V.FURBER:
YEAST Chromatin Structure
FEBS Lett. 66 (1976) 274 - 280

14 J.L.COMPTON, M.BELLARD und P.CHAMBON:
Biochemical Evidence of Variability in the DNA Repeat Length in the Chromatin of Higher Eukaryotes
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 (1976) 4382 - 4386

15 M.NOLL:
Differences and Similarities in Chromatin Structure of Neurospora Crassa and Higher Eucaryotes
Cell 8 (1976) 349 - 355

16 C.SPADAFORA, M.BELLARD, J.L.COMPTON und P.CHAMBON:
The DNA Repeat Lengths in Chromatins from Sea Urchin Sperm and Gastrula Cells are Markedly Different
FEBS Lett. 69 (1976) 281 - 285

17 B.R.SHAW, T.M.HERMAN, R.T.KOVACIC, G.S.BEAUDREAU und K.E.VAN HOLDE:
Analysis of Subunit Organization in Chicken Erythrocyte Chromatin.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 (1976) 505 - 509

18 M.BUSTIN und R.D.COLE:
Species and Organ Specificity in Very Lysine rich Histones
J.Biol.Chem. 243 (1968) 4500 - 4505

19 A.J.MAC GILLIVRAY:
In Subnuclear Components
G.D.BIRNIE ed. (1976) Butterworths, London/Boston

20 J.L.PETERSON und E.H.MC CONKEY:
Non-Histone Chromosomal Proteins from HeLa Cells
J.Biol.Chem. 251 (1976) 548 - 554

21 J.L.PETERSON und E.H.MC CONKEY:
Proteins of Friend Leukemia Cells
J.Biol.Chem. 251 (1976) 555 - 558

22 A.J.MAC GILLIVRAY, A.CAMERON, R.J.KRAUZE, D.RICKWOOD und J.PAUL:
The Non-Histone Proteins of Chromatin; their Isolation and Composition in a Number of Tissues
Biochem. Biophys. Acta 277 (1972) 384 - 402

23 W.BENJAMIN und A.GELLHORN:
Acidic Proteins of Mammalian Nuclei: Isolation and Characterization
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 59 (1968) 262 - 268

24 K.MARUSHIGE, D.BRUTLAG und J.BONNER:
Properties of Chromosomal Nonhistone Protein of Rat Liver
Biochemistry 7 (1968) 3149 - 3155

25 S.C.R.ELGIN und J.BONNER:
Partial Fractionation and Chemical Characterization of the Major Nonhistone Chromosomal Proteins
Biochemistry 11 (1972) 772 - 781

26 A.J.MAC GILLIVRAY und D.RICKWOOD:
The Heterogeneity of Mouse Chromatin Nonhistone Proteins as Evidenced by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Ion-Exchange Chromatography
Eur.J.Biochem. 41 (1974) 181 - 190

27 F.C.WU, S.C.R.ELGIN und L.E.HOOD:
Nonhistone Chromosomal Proteins of Rat Tissues. A Comparative Study by Gel Electrophoresis
Biochemistry 12 (1973) 2792 - 2797

28 C.S.TENG, C.T.TENG und V.G.ALLFREY:
Studies of Nuclear Acidic Proteins
J.Biol.Chem. 246 (1971) 3597 - 3609

29 J.PAUL und R.S.GILMOUR:
Organ specific Restriction of Transcription in Mammalian Chromatin
J.Mol.Biol. 34 (1968) 305 - 316

30 J.PAUL, R.S.GILMOUR, N.AFFARA, G.BIRNIE, P.HARRISON A.HELL, S.HUMPHRIES, J.WINDASS, B.YOUNG:
The Globin Gene: Structure and Expression
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 38 (1973) 885 -890

31 T.BARRETT, D.MARYANKA, P.H.HAMLYN, H.J.GOULD:
Nonhistone Proteins Control Gene Expression in Reconstituted Chromatin
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71 (1974) 5057 - 5061

32 M.D.CAVE:
Chromosome Replication and synthesis of Non-Histone Proteins in Giant Polytene Chromosomes
Chromosoma 25 (1968) 392 - 401

33 G.STEIN und R.BASERGA:
Continued Synthesis of Non-Histone Chromosomal Proteins During Mitosis
Biochem. Biophys. Res.Commun. 41 (1970) 715 - 722

34 M.E.GROSS:
Changes in Nuclear Protein during the Cell Cycle in Cultured Mast Cells Separated by Zonal Centrifugation
Biochem. J. 128 (1972) 1213 - 1219

35 L.R.KUEHL:
Rapid Turnover of Non-Histone Chromosomal Proteins in Skeletal Muscle
Exp. Cell Res. 92 (1975) 221 - 230

36 M.E.COHEN und T.H.HAMILTON:
Effect of Estradiol 17 ß on the Synthesis of Specific Uterine Nonhistone Chromosomal Proteins
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72 (1975) 4346 - 4350

37 D.SURIA und C.C.LIEW:
Isolation of Nuclear Acidic Proteins from Rat Tissues
Biochem. J. 137 (1974) 355 - 362

38 T.W.BORUN, D.PEARSON und W.K.PAIK:
Studies of Histone Methylation during the HELA S-3 Cell Cycle
J.Biol.Chem. 247 (1972) 4288 - 4298

39 W.BENJAMIN und A.GELLHORN:
Acidic Proteins of Mammalian Nuclei: Isolation and Characterization
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 59 (1968) 262 - 268

40 J.BONNER, M.E.DAHMUS, D.FAHMBROUGH, R.C.HUANG,K. MARUSHIGE und D.Y.H.TUAN:
The Biology of Isolated Chromatin
Science 159 (1968) 47 - 56

41 T.SHIREY und R.C.HUANG:
Use of Sodium Dodecyl Sulfate, Alone, to Separate Chromatin Proteins from Deoxyribonucleoprotein of Arbacia punctulata Sperm Chromatin
Biochemistry 8 (1969) 4138 - 4148

42 K.MARUSHIGE, D.BRUTLAG und I.BONNER:
Properties of Chromosomal Nonhistone Protein of Rat Liver
Biochemistry 7 (1968) 3149 - 3155

43 T.Y.WANG:
The Isolation, Properties and Possible Functions of Chromatin Acidic Proteins
J.Biol.Chem. 242 (1967) 1220 - 1226

44 V.HOLOUBEK und T.T.CROCKER:
DNA Associated Acidic Proteins
Biochim. Biophys. Acta 157 (1968) 352 - 361

45 S.LEVY, R.T.SIMPSON und H.A.SOBER:
Fractionation of Chromatin Components
Biochemistry 11 (1972) 1547 - 1554

46 G.BLOBEL und U.R.POTTER:
Nuclei from Rat Liver: Isolation Method That Combines Purity with Hihg Yield
Science 154 (1966) 1662 - 1665

47 D.R.HEWISH und L.A.BURGOYNE:
Chromatin Sub-Structure
Biochem.Biophys.Res.Commun.52 (1973) 504 - 510

48 C.H.W.HIRS:
Chromatography of Enzymes on Ion Exchange Resins
Methods Enzymol.I (1955) 113 - 125

49 M.NOLL, J.O.THOMAS und R.D.KORNBERG:
Preparation of Native Chromatin and Damage Caused by Shearing
Science 187 (1975) 1203 - 1206

50 J.J.LAWRENCE, D.C.F.CHAN und L.H.PIETTE:
Conformational State of DNA in Chromatin Subunits. Circular Dichroism, Melting and Ethidium Bromide Binding Analysis
Nucl.Acid Res. 3 (1976) 2879 - 2893

51 E.S.VALMET:
Vorrichtung zum isoelektrischen Trennen von ampholytischen Mischungen
Patentschrift vom 10.5.1968: Nr.1 923 613

52 R.RÜCHEL, S.Mesecke, D.I.WOLFRUM und V.NEUHOFF:
Mikroelektrophorese an kontinuierlichen Polyacrylamid - Gradientengelen I
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 354 (1973) 1351 - 1368

53 R.RÜCHEL, S.MESECKE, D.I.WOLFRUM und V.NEUHOFF:
Micro-Electrophoresis in Continuous Polyacrylamide Gradient Gels II
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355 (1974) 997 - 1020

54 D.I.WOLFRUM, R.RÜCHEL, S.MESECKE und V.NEUHOFF:
Mikroelektrophorese in kontinuierlichen Polyacrylamid Gradientengelen III
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355 (1974) 1415 - 1435

55 R.RÜCHEL, Chr.RICHTER LANDSBERG und V. NEUHOFF:
Mikroelektrophorese in kontinuierlichen Polyacrylamid Gradientengelen IV
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356 (1975) 1283 - 1288

56 E.KALTSCHMIDT und H.G.WITTMANN:
Ribosomal Proteins, VII. Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins
Anal.Biochem. 36 (1970a) 401- 412

57 F.A.VENTIMIGLIA und I.G.WOOL:
A Kinase that Transfers the γ-Phosphoryl Group of GTP to Proteins of Eucaryotic 40 S Ribosomal Subunit
Proc.Natl.Acad.Sci. 71 (1974) 350 - 354

58 A.R.SUBRAMANIAN:
Sensitive Separation Procedure for Escherichia coli Ribosomal Proteins and the Resolution of High-Molecular-Weight-Components
Eur.J.Biochem. 45 (1974) 541 - 546

59 K.Li und A.R.SUBRAMANIAN:
Selective Separation Procedure for Determination of Ribosomal Proteins L7 and L12
Anal.Biochem. 64 (1975) 121 - 129

60 L.J.METS und L.BOGORAD:
Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis: An Improved Method for Ribosomal Proteins
Anal.Biochem. 57 (1974) 200 - 210

61 K.BURTON:
A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid
Biochem.J. 62 (1956) 315 - 323

62 G.CERIOTTI:
Determination of Nucleic Acids in Animal Tissues
J.Biol.Chem. 214 (1955) 59 - 70

63 V.I.OYAMA und H.EAGLE:
Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu 22245)
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 91 (1956) 305-307

64 E.STEDMAN und E.STEDMAN:
Cell Specificity of Histones
Nature 166 (1950) 780 - 781

65 V.G.ALLFREY, V.C.LITTAU und A.E.MIRSKY:
On the Role of Histones in Regulating Ribonucleic Acid Synthesis in the Cell Nucleus
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 49 (1963) 414 - 421

66 R.C.C.HUANG und J.BONNER:
Histone, A Suppressor of Chromosomal RNA Synthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 48 (1962) 1216 - 1222

67 L.S.HNILICA:
The Structure and Biological Functions of Histones
Chemical Rubber Publishing Co, Cleveland, Ohio (1972)

68 R.BASERGA und G.S.STEIN:
Nuclear Acidic Proteins and Cell Proliferation
Fed.Proc. 30 (1971) 1752 - 1759

69 G.S.STEIN, T.C.SPELSBERG und L.J.KLEINSMITH:
Nonhistone Chromosomal Proteins and Gene Regulation
Science 183 (1974) 817 - 824

70 A.E.MIRSKY und A.W.POLLISTER:
Chromosin, A Desoxyribose Nucleoprotein Complex of the Cell Nucleus
J.Gen.Physiol. 30 (1946) 117 - 143

71 T.Y.WANG:
Solubilization and Characterization of the Residual Proteins of the Cell Nucleus
J.Biol.Chem. 241 (1966) 2913 - 2917

72 T.Y.WANG:
The Isolation, Properties and Possible Functions of Chromatin Acidic Proteins
J.Biol.Chem. 242 (1967) 1220 - 1226

73 I.BEKHOR, G.M.KUNG und J.BONNER:
Sequence - specific Interaction of DNA and Chromosomal Protein
J.Mol.Biol. 39 (1969) 351 - 364

74 S.L.GRAZIANO und R.C.C.HUANG:
Chromatographic Separation of Chick Brain Chromatin Proteins Using a SP Sephadex Column
Biochemistry 10 (1971) 4770 - 4777

75 R.J.HILL, D.L.POCCIA und P.DOTY:
Towards a Total Macromolecular Analysis of Sea Urchin Embryo Chromatin
J.Mol.Biol. 61 (1971) 445 - 462

76 S.LEVY, R.T.SIMPSON und H.A.SOBER:
Fractionation of Chromatin Components
Biochemistry 11 (1972) 1547 - 1554

77 R.LEVY, S.LEVY, S.A.ROSENBERG und R.T.SIMPSON:
Selctive Stimulation of Nonhistone Chromatin Protein Synthesis in Lymphoid Cells by Phytohemagglutinin
Biochemistry 12 (1973) 224 - 228

78 T.C.SPELSBERG und L.S.HNILICA:
Deoxyribonucleoproteins and the Tissue Specific Restriction of the Deoxyribonucleic Acid in Chromatin
Biochem.J. 120 (1970) 435 - 437

79 K.H.RICHTER und C.E.SEKERIS:
Isolation and Partial Purification of Non-Histone Chromosomal Proteins from Rat Liver Thymus
Arch.Biochem.Biophys. 148 (1972) 44 - 53

80 E.A.ARNOLD und K.E.YOUNG:
Isolation and Partial Electrophoretic Characterization of Total Protein from Non-Sheared Rat Liver Chromatin
Biochim.Biophys.Acta 257 (1972) 482 - 496

81 M.YOSHIBA und K.SHIMURA:
Isolation of Nonhistone Chromosomal Protein from Calf Thymus
Biochem.Biophys.Acta 263 (1972) 690 - 695

82 L.M.J.SHAW und R.C.C.HUANG:
A Description of Two Procedures which Avoid the Use of Extreme pH Conditions for the Resolution of Components Isolated from Chromatins Prepared from Pig Cerebellar and Pituitary Nuclei
Biochemistry 9 (1970) 4530 - 4542

83 K.WAKABAYASHI, S.WANG und L.S.HNILICA:
Immunospecificity of Nonhistone Proteins in Chromatin
Biochemistry 13 (1974) 1027 - 1032

84 J.F.CHIU, M.HUNT und L.S.HNILICA:
Tissue-specific DNA-Protein Complexes during Azo Dye Hepatocarcinogenesis
Cancer Res. 35 (1975) 913 - 919

85 R.S.GILMOUR und J.PAUL:
Role of Non-Histone Components in Determining Organ Specificity of Rabbit Chromatins
FEBS Lett. 9 (1970) 242 - 244

86 S.CHAUDHURI:
Fractionation of Chromatin Nonhistone Proteins
Biochim.Biophys.Acta 322 (1973) 155 - 165

87 J.BONNER, G.R.CHALKLEY, M.DAHMUS, D.FAMBROUGH, F.FUJIMURA, R.C.C.HUANG, J.HUBERMANN, R.JENSEN, K.MARUSHIGE, H.OHLENBUSCH, B.M.OLIVERA und J.WIDHOLM:
Isolation and Characterization of Chromosomal Nucleoproteins
Methods Enzymol. 12 B (1968) 3 - 65

88 L.C.YEOMAN, C.W.TAYLOR und H.BUSCH:
Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Acid Extractable Nuclear Proteins of Normal Rat Liver and Novikoff Hepatoma Ascites Cells
Biochim. Biophys. Res. Commun. 51 (1973) 956 - 966

89 T.BARRETT und H.J.GOULD:
Tissue and Species Specificity of Non-Histone Chromatin Proteins
Biochim. Biophys. Acta 294 (1973) 165 - 170

90 A.J.MAC GILLIVRAY und D. RICKWOOD:
The Heterogeneity of Mouse-Chromatin Nonhistone Proteins as Evidenced by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Ion Exchange Chromatography
Eur.J.Biochem. 41 (1974) 181 - 190

91 D.SURIA und C.C.LIEW:
Isolation of Nuclear Acidic Proteins from Rat Tissues
Biochem.J.137 (1974) 355 - 362

92 D.RICKWOOD und A.J.MAC GILLIVRAY:
Improved Techniques for the Fractionation of Non-Histone Proteins of Chromatin on Hydroxyapatite
Eur.J.Biochem. 51 (1975) 593 - 601

93 D.SURIA und C.C.LIEW:
Isolation and Analysis of Non-Histone Chromatin Proteins from Rat Liver Nuclei by Three Different Methods
Canad.Biochem. 52 (1974) 1143 - 1153

94 J.L.PETERSON und E.H.MC CONKEY:
Non-Histone Chromosomal Proteins from HeLa Cells
J.Biol.Chem. 251 (1976) 548 - 554

95 CHR.KRUEGER:
Fraktionierung und chemische Charakterisierung von chromosomalen Proteinen aus laktierendem Kuheuter
Dissertation, FU Berlin 1976

96 K.MARUSHIGE und J.BONNER:
Properties of Chromosomal Nonhistone Protein of Rat Liver
Biochemistry 7 (1968) 3149 - 3155

97 A.L.DOUNCE und R.ICKOWICZ:
The Effect of the Method of Isolation of Cell Nuclei on the Ratios of Nuclear Proteins to DNA
Arch.Biochem.Biophys. 131 (1969) 359 - 368

98 R.HOWK und T.Y.WANG:
DNA Polymerase from Rat Liver Chromosomal Proteins
Arch.Biochem.Biophys. 136 (1970) 422 - 429

99 CHI BOM CHAE und D.B.CARTER:
Degradation of Chromosomal Proteins During Dissociation and Reconstitution of Chromatin
Biochem.Biophys.Res.Commun. 57 (1972) 740 - 746

100 S.B.ZIMMERMANN und C.J.LEVIN:
A Deoxyribonucleic Acid Ligase from Nuclei of Rat Liver
J.Biol.Chem. 250 (1975) 149 - 155

101 O.L.MILLER und B.R.BEATTY:
Portait of a Gene
J.Cell Physiol. 74 Suppl.1 (1969) 225 - 231

102 B.R.REID und R.D.COLE:
Biosynthesis of a Lysine-Rich Histone in Isolated Calf Thymus Nuclei
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 51 (1964) 1044 - 1050

103 C.B.CHAE und D.B.CARTER:
Degradation of Chromosomal Proteins During Dissociation and Reconstitution of Chromatin
Biochem.Biophys.Res.Commun. 57 (1974) 740 - 746

104 M.T.CHONG, W.T.GARRARD und J.BONNER:
Purification and Properties of a Neutral Protease from Rat Liver Chromatin
Biochemistry 13 (1974) 5128 - 5134

105 A.S.DOUVAS, C.A.HARRINGTON und J.BONNER:
Major Nonhistone Proteins of Rat Liver Chromatin: Preliminary Identification of Myosin, Actin, Tubulin und Tropomyosin
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72 (1975) 3902 - 3906

106 W.M.LESTOURGEON, A.FORER, Y.Z.YANG, J.S.BERTRAM und H.P.RUSCH:
Contractile Proteins. Major Components of Nuclear and Chromosome Non-histone Proteins
Biochim.Biophys.Acta 379 (1975) 529 - 552

Anmerkung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekular - biologie und Biochemie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Pollow angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.Pollow für An - regung und Förderung dieser Arbeit.

Ich danke ferner Frau Barbara Pollow für ihre stete Hilfs- bereitschaft und Herrn Dr. Krüger für seine in Diskussionen geäußerten Ratschläge.

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name: | H e ß l i n g e r Hermann |
| geb.am: | 21.7.1946 |
| in: | München |
| Eltern: | Heßlinger Franz |
| | Heßlinger Katharina geb.Metz |
| Wohnort: | 1000 Berlin 44 |
| | Weichselstr. 38 |
| Schulausbildung: | 1952 - 1957 Volksschule |
| | 1957 - 1963 Klenze Gymnasium |
| | 1963 - 1967 Verwaltungsangestellter |
| | 1968 - 1970 Abitur am Münchenkolleg |
| Studium: | 1970 - 1971 Chemie/Physik für Lehramt München |
| | 1971 - 1975 Biologiestudium an der FU Berlin |
| | Hauptdiplomprüfung July 1975 |

Seit Oktober 1975 arbeite ich an der Freien Universität Berlin am Institut für Molekularbiologie und Biochemie in der Arbeitsgruppe Pollow.

Meine wissenschaftliche Ausbildung verdanke ich den Hochschullehrern:

G.Obe, W.Laskowski, H.J.Belitz, H.Nöthel, G.Werz, H.Clauss E.R.Lochmann, E.Wachmann, J.Brandenburg, K.Graszynski, W.Knülle, K.Pollow.

T.O.M. DISSERTATIONSDRUCK · Lützowstr. 102-104 · 1000 Berlin 30 · ☎ 030 / 2 62 40 77